

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Immuntherapeutische Strategien für Patienten mit Weichteilsarkomen:
Augmentation der Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen mittels *ex vivo*-Expansion und
Verwendung eines Anti-GD2 Antikörpers**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tobias Justus Jorg
aus
Wiesbaden
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatte	Prof. Dr. med. Marion Subklewe
Mitberichterstatte	Prof. Dr. med. Stefan Endres
	Prof. Dr. med Hans Roland Dürr
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter	Dr. med. Veit Bücklein
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	29.11.2018

Eidesstattliche Versicherung

Jorg, Tobias Justus

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Immuntherapeutische Strategien für Patienten mit Weichteilsarkomen:
Augmentation der Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen mittels ex vivo-Expansion und
Verwendung eines Anti-GD2 Antikörpers**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 29.11.2018

Ort, Datum

T. Jorg

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Weichteilsarkome</i>	1
1.1.1	Grundlagen	2
1.1.2	Therapieprinzipien	3
1.1.2.1	Zytostatika	4
1.1.2.2	Zielgerichtete Therapie	5
1.2	<i>Immuntherapie</i>	5
1.2.1	Grundlagen	5
1.2.2	Historie	6
1.2.3	Konzepte	7
1.3	<i>Natürliche Killerzellen</i>	8
1.3.1	Physiologische Funktion	8
1.3.1.1	Aktivierung	8
1.3.1.2	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)	9
1.3.1.3	Stimulation durch Interleukine	9
1.3.2	Funktion bei Patienten mit Krebserkrankungen	10
1.4	<i>GD2-Antigen</i>	10
1.4.1	Rolle als Targetantigen	11
1.5	<i>Anti-GD2 Antikörper</i>	12
1.5.1	ch14.18	12
1.5.1.1	Präklinische Daten	12
1.5.1.2	Klinische Studien und Zulassung	13
1.5.2	ME36.1	13
1.5.2.1	Präklinische Daten	13
2	Fragestellung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	<i>Material</i>	16
3.1.1	Geräte	16
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3	Reagenzien	17
3.1.3.1	Medien und Chemikalien	17
3.1.3.2	FACS-Antikörper und Isotypkontrollen	18
3.1.3.3	Therapeutische Antikörper	19
3.1.3.4	FISH-Sonden	19
3.1.3.5	Zytokine	19
3.1.4	Zelllinien	19
3.2	<i>Methoden</i>	20
3.2.1	Patienten- und Spenderproben	20
3.2.2	Isolation von Effektorzellen	20
3.2.2.1	Isolation von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation	20
3.2.2.2	Isolation von NK-Zellen aus PBMCs mittels MACS	21
3.2.3	Zellkultur	21
3.2.3.1	NK-Zellen und PBMCs	21
3.2.3.2	Expansion von NK-Zellen	22
3.2.3.3	Tumorzellen	22
3.2.4	Zellzählung	23
3.2.5	Durchflusszytometrie	23
3.2.5.1	Oberflächenmarkerfärbung	24
3.2.6	⁵¹ Chrom-Freisetzungs-Assay	24
3.2.6.1	Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen	25
3.2.7	Fluoreszenz-Aktivierte Zellsortierung	26
3.2.7.1	GD2-basierte Sortierung von Sarkomzellen	26
3.2.8	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	27

3.2.8.1	Vergleich von Sarkomzell-Subpopulationen mittels Nachweis numerischer chromosomaler Aberrationen	28
3.2.9	Statistische Auswertung	29
4	Ergebnisse	30
4.1	<i>Patienten und Spendercharakteristika</i>	30
4.1.1	Patientencharakteristika	30
4.1.2	Spendercharakteristika	31
4.2	<i>Zytotoxizität durch NK-Zellen gegen K562-Zellen von Spendern und Patienten</i>	31
4.3	<i>GD2-Expression verschiedener Tumorzelllinien</i>	32
4.3.1	Antikörper-Titration	32
4.3.2	Neuroblastom-Zelllinien als Positivkontrolle (LAN-1 und LS)	33
4.3.3	Liposarkom-Zelllinie (SW872)	34
4.3.4	Ewing-Sarkom-Zelllinien (TC-71 und RD-ES)	34
4.3.5	Leiomyosarkom-Zelllinie (SKUT-1)	35
4.3.6	Rhabdomyosarkom-Zelllinien (RH-18 und A673)	36
4.3.7	Synovialsarkom-Zelllinie (SW982)	36
4.4	<i>GD2-vermittelte Zytotoxizität durch unstimulierte NK-Zellen bei Sarkom-Zelllinien</i>	37
4.4.1	Titration der Anti-GD2-Antikörper-Konzentration (ch14.18)	37
4.4.2	Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender	38
4.4.2.1	Liposarkom-Zelllinie (SW872)	38
4.4.2.2	Ewing-Sarkom-Zelllinie (TC-71)	39
4.4.2.3	Leiomyosarkom-Zelllinie (SKUT-1)	40
4.4.2.4	Vergleich der GD2-vermittelten NK-Zytotoxizität für Anti-GD2-Antikörper (ch14.18 vs ME36.1)	41
4.4.3	Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen von Sarkompatienten	41
4.4.3.1	Liposarkom-Zelllinie (SW872)	42
4.4.4	Vergleich der Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen von Patienten und Spendern	43
4.4.4.1	Liposarkom-Zelllinie (SW872)	43
4.5	<i>Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gesunder Spender</i>	44
4.5.1	Liposarkom-Zelllinie (SW872)	45
4.5.2	Ewing-Sarkom-Zelllinie (TC-71)	46
4.5.3	Leiomyosarkom-Zelllinie (SKUT-1)	47
4.6	<i>GD2-vermittelte Zytotoxizität durch expandierte NK-Zellen gesunder Spender</i>	47
4.6.1	Liposarkom-Zelllinie (SW872)	47
4.6.1.1	Vergleich frischer und kryokonservierter NK-Zellen	48
4.6.1.2	Interleukin-Restimulation kryokonservierter NK-Zellen	49
4.6.2	Ewing-Sarkom-Zelllinie (TC-71)	50
4.6.3	Leiomyosarkom-Zelllinie (SKUT-1)	51
4.7	<i>Durchflusszytometrie-basierte Sortierung der partiell GD2-positiven Liposarkomzelllinie SW872</i>	51
4.7.1	Kinetik der GD2-Expression	52
4.7.2	Vergleich beider Subpopulationen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung	53
4.7.3	Ergebnisse der Zelllinien-Authentifizierung	56
4.7.4	Vergleich der GD2-vermittelten Zytotoxizität beider Subpopulationen	58
5	Diskussion	60
5.1	<i>Sarkompatienten zeigen eine Dysfunktion Natürlicher Killerzellen</i>	60
5.2	<i>Weichteilsarkome exprimieren GD2</i>	61
5.3	<i>Verwendung von Anti-GD2 Antikörpern erhöht die Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen mittels ADCC</i>	62
5.4	<i>Expansion Natürlicher Killerzellen führt zu erhöhter Zytotoxizität</i>	65
5.5	<i>GD2 als mögliches Marker-Antigen für Cancer stem cells</i>	67
5.6	<i>Ausblick: Möglichkeit der Beeinflussung der GD2-Expression von Weichteilsarkomen in vivo</i>	69
6	Zusammenfassung	72

7	Literaturverzeichnis	74
8	Anhang	80
8.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	80
8.2	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	83
8.3	<i>Tabellenverzeichnis</i>	84
8.4	<i>Patienten- und Probandeninformation</i>	85
8.5	<i>Danksagung</i>	90
8.6	<i>Veröffentlichungen</i>	91
8.6.1	Poster	91
8.7	<i>Lebenslauf</i>	92

1 Einleitung

Weltweit erkrankten 2012 schätzungsweise 14,1 Millionen Menschen an Krebs. Im gleichen Zeitraum gab es 8,2 Millionen Todesfälle durch Krebs. Aufgrund von Wachstum und Alterung der Bevölkerung wird ein weiterer Anstieg dieser Zahlen erwartet.¹ In Deutschland starben 2015 insgesamt 233.752 Menschen an einer Krebserkrankung. Mit einem Anteil von über 25 Prozent an allen Todesfällen in Deutschland sind Krebserkrankungen damit nach Herz-Kreislauf-erkrankungen weiterhin die zweithäufigste Todesursache. Die meisten Todesfälle machten dabei Krebserkrankungen des Darms, der Lunge und Bronchien, sowie der Brust aus.² Neben den massiven Auswirkungen, welche die Diagnose einer Krebserkrankung für den Einzelnen mit sich bringt, resultiert aus diesen Zahlen auch eine deutliche volkswirtschaftliche Beeinträchtigung. Die jährlichen Krebs-assoziierten Krankheitskosten bewegen sich hierzulande im zweistelligen Milliardenbereich.³

Im Vergleich zu den zuvor genannten Tumorentitäten haben Weichteilsarkome, deren Therapie Thema dieser Arbeit ist, eine sehr geringe Inzidenz. Sie machen lediglich knapp ein Prozent aller Krebsneuerkrankungen aus.⁴ Durch das seltene Auftreten ist die individuelle Versorgung von Patienten jedoch nicht einfach. Noch mehr als bei häufigeren Tumorerkrankungen erschweren niedrige Fallzahlen die Durchführung von Studien mit hoher Evidenzklasse und somit auch die Definition von Therapiestandards. Zudem gibt es viele verschiedene Subtypen von Weichteilsarkomen, die sich in ihrem Ansprechen auf einzelne Therapieprotokolle deutlich unterscheiden können. Deshalb sind neue, gegebenenfalls patientenindividuell ausgewählte Therapien notwendig.

Dazu gehören auch immuntherapeutische Behandlungskonzepte, zu denen in der vorliegenden Dissertation präklinische Daten für die Therapie von Weichteilsarkomen erhoben werden. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf Natürlichen Killerzellen, die durch die Nutzung von Anti-GD2 Antikörpern und *ex vivo*-Stimulation zu einer verbesserten Krebszell-Erkennung und Bekämpfung eingesetzt werden sollen.

1.1 Weichteilsarkome

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen menschlichen Weichteilsarkom-Zelllinien und mit Blut von Weichteilsarkom-Patienten gearbeitet. Das folgende Kapitel dient dazu, einen Überblick über die Grundlagen, Epidemiologie, Ätiologie, Diagnose und Therapiemöglichkeiten dieser Erkrankung zu verschaffen.

1.1.1 Grundlagen

Bei Weichteilsarkomen (soft-tissue sarcomas, STS) handelt es sich um maligne Tumoren des Bindegewebes. Als Bindegewebe sind in diesem Kontext nicht-epitheliale, extraskellettale Gewebe, wie Muskel, Fett und fibröses Stützgewebe definiert.⁵ Die jährliche Inzidenz von STS beträgt circa 1,5-2/100.000 Einwohner. Während sie insgesamt nur ein Prozent aller malignen Tumoren repräsentieren, machen STS einen Anteil von 15% aller kindlichen und juvenilen Tumorerkrankungen aus.⁶ 60% aller STS treten an der oberen oder unteren Extremität auf. Weitere häufige Lokalisationen sind Intra- und Retroperitoneum mit circa 20%.⁵ Insgesamt gibt es über 50 verschiedene histologische Subtypen von STS, wobei die Diagnose von einzelnen STS-Subentitäten Auswirkungen auf Klinik, Prognose und Therapie der Erkrankung hat.⁷ Dies wird vor allem anhand von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) deutlich (Vgl. Kapitel 1.1.2.2). Am Häufigsten treten Leiomyosarkome, Pleomorphe Sarkome und Liposarkome auf.⁶

STS treten meist sporadisch auf, ihre genaue Ätiologie ist weitestgehend ungeklärt. Dennoch wird die Entstehung mit verschiedenen Umwelt- und genetischen Faktoren, sowie mit Bestrahlung, Virusinfektionen und Immunschwäche assoziiert.⁷ Beispielsweise beschrieben Hardell et. al. die Exposition gegenüber polychlorierten Dibenzodioxinen und Dibenzofuranen - Chemikalien, die unter anderem in Herbiziden verwendet werden - als karzinogen für STS.⁸ Auch Fälle von sekundären STS nach Radiotherapie einer anderen Krebserkrankung, vor allem Brustkrebs, Lymphome und Zervixkarzinome, sind in der Literatur beschrieben. Diese haben in der Regel eine ungünstige Prognose.⁹ Als seltene Komplikation einer radikalen Mastektomie kann im Rahmen eines chronischen Lymphödems auch ein Lymphangiosarkom entstehen (Stewart-Treves-Syndrom). Einige Erbkrankheiten gehen ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für STS einher. So haben Patienten, die an Morbus Recklinghausen leiden, eine zehnpromtente Wahrscheinlichkeit im Laufe des Lebens an einem malignen peripheren Nervenscheidentumor zu erkranken.⁵ Beim Li-Fraumeni-Syndrom, das durch eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 verursacht wird, kommt es zu einem stark erhöhten Risiko der Entwicklung eines STS oder Knochensarkoms bereits um das 30. Lebensjahr. Auch eine Erkrankung an der hereditären Form des Retinoblastoms wird mit dem Auftreten eines STS im weiteren Verlauf assoziiert.⁷

Klinisch gesehen gibt es keine STS-spezifischen Symptome. An Extremitäten fallen sie oft als größenprogrediente, schmerzlose Schwellungen auf. Aufgrund ihrer Seltenheit und oftmals langsamen Wachstums besteht die Gefahr der Verwechslung mit einer benignen Läsion. Dies kann mitunter zu einer verspäteten Diagnosestellung führen. Die Größe des Tumors bei Diagnose hängt oft von der Lokalisation ab. An Kopf, Hals und distalen Extremitäten werden STS meist früher wahrgenommen, während retroperitoneale Tumoren bei Entdeckung oft sehr groß sind, da diese durch das bloße Auge - beziehungsweise durch

Inspektion und körperliche Untersuchung - nicht immer wahrnehmbar sind. Häufiger Vorstellungsgrund der Patienten sind Parästhesien, Miktionsstörungen oder Ödeme, welche aufgrund von Druckerhöhungen auf die entsprechenden Strukturen durch das Tumorwachstum zu erklären sind.^{5,7}

Beim klinischen Verdacht auf ein STS wird in der entsprechenden Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) zunächst eine lokale Ausbreitungsdiagnostik mittels MRT empfohlen. Falls sich der Verdacht erhärten sollte, folgt eine anschließende CT-Untersuchung des Thorax und Abdomens zur Beurteilung einer möglichen systemischen Ausbreitung des Tumors. Im Anschluss an die Bildgebung erfolgt eine Biopsie des Tumors. Sowohl eine offene Inzisionsbiopsie als auch eine bildgebungsgestützte Stanzbiopsie sind hier Mittel der Wahl.⁶ Bei STS-verdächtigen retroperitonealen Raumforderungen, die mittels Bildgebung als vollständig resezierbar erachtet werden können, sollte im Regelfall auf die Biopsie verzichtet werden, da die Gefahr der transperitonealen Verstreuung von Tumorzellen erhöht ist.¹⁰

Die Nomenklatur der weit über 50 verschiedenen STS-Subtypen orientiert sich an dem Gewebetyp, mit dem sie histologisch die größte Übereinstimmung aufweisen. So werden Tumoren, die histologisch Fettgewebe ähneln als Liposarkome bezeichnet. Ist eine Zuordnung zu einem Ursprungsgewebe nicht möglich, bezeichnet man den Tumor z.B. als undifferenziertes pleomorphes Sarkom. Das Tumor-Grading erfolgt anhand des dreistufigen FNCLCC Systems. Dabei werden Differenzierung, mitotische Aktivität und Nekrose der Tumorzellen beurteilt. Es wird zwischen niedrig-, mittel- und hochgradig malignen Tumoren unterscheiden.^{6,11} Die Stadieneinteilung des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) für STS berücksichtigt neben dem histopathologischen Grading die ebenfalls prognostisch relevante Eindringtiefe des Tumors (ob er oberhalb der oberflächlichen Faszia liegt oder diese infiltriert), die Größe des Tumors, sowie das Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen.¹² Anhand dieser Einteilung ergeben sich für die Stadien I, II, III und IV 5-Jahres-Überlebensraten von circa 90, 70, 50 und 20 Prozent. Darüber hinaus wird die Prognose vom Subtyp und der Tumorlokalisation beeinflusst.¹³

1.1.2 Therapieprinzipien

Standardtherapie für STS ist die operative Entfernung im Gesunden (R0). Ziel dabei ist es, dass der Resektionsrand im gesunden Gewebe liegt. Bei Lokalisation des Tumors in der Nähe von vitalen oder anatomisch begrenzenden Strukturen ist dies oft nicht möglich. Ein metrischer als onkologisch sicher eingestufte Resektionsabstand ist bisher nicht definiert. Marginale Resektionen (R1) gehen mit einem stark erhöhten Rezidivrisiko einher. Bei intraläsionalen Resektionen (R2) kommt es ohne weitere Behandlung stets zu einem Rezidiv.⁶

Zusätzlich wird, vor allem bei tiefen und hoch malignen Tumoren, eine adjuvante Strahlentherapie durchgeführt. Die eingesetzte Gesamtdosis beträgt in der Regel 50-66 Gy.^{6,14} Bei Patienten mit retroperitonealen STS kann die anwendbare Strahlendosis durch Nähe des Tumors zu strahlensensitiven Organen und den damit verbundenen Nebenwirkungen stark limitiert sein.⁵

Oftmals ist durch Operation und Strahlentherapie alleine keine Heilung oder ausreichende lokale Tumorkontrolle möglich.¹⁵

1.1.2.1 Zytostatika

Chemotherapeutika werden in der Therapie von STS sowohl in kurativer als auch in palliativer Indikation eingesetzt. Generell ist das Ansprechen von STS auf konventionelle Chemotherapien nur mäßig. Der Stellenwert von Zytostatika wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Im kurativen Ansatz kommen neoadjuvante und adjuvante Therapieschemata zum Einsatz.^{6,16}

Neoadjuvante Therapien werden bei lokal fortgeschrittenen STS mit hohem Risikoprofil (tiefe Lokalisation, hoher Malignitätsgrad) zur Reduktion des Risikos eines Systemprogresses eingesetzt. Zusätzlich zur Chemotherapie kann hier eine Behandlung mit Regionaler Hyperthermie (RHT) erfolgen. Issels et. al. konnten in einer Phase-III-Studie zeigen, dass die RHT-Behandlung einen additiven Effekt zur Polychemotherapie mit Etoposid, Ifosfamid und Doxorubicin (EIA) hat. Sowohl die Ansprechraten als auch progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben konnten durch Hinzunahme der RHT signifikant verbessert werden.¹⁷ Weiter kann eine neoadjuvante Chemotherapie vor Metastasenchirurgie eingesetzt werden.⁶ Adjuvante Therapien werden meist mit einer Kombination aus Doxorubicin und Ifosfamid (AI) durchgeführt. Sie kommen nach unzureichender Resektion (R1/2) oder bei schlecht differenzierten, tiefen Tumoren, bei denen ein hohes Rezidivrisiko zu erwarten ist, zum Einsatz. Die Entscheidung über die Anwendung einer adjuvanten Chemotherapie sollte, aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen zu ihrem Nutzen, im Einzelfall zusammen mit dem Patienten in einem Zentrum erfolgen.¹⁸ So beobachteten Italiano et. al. in einer großen Registerstudie eine marginale Verbesserung des Gesamtüberlebens bei Grad 3 Tumoren, nicht aber bei Grad 2 Tumoren.¹⁹ Eine randomisiert-kontrollierte Studie im Auftrag der *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) konnte hingegen keinen Vorteil einer adjuvanten Chemotherapie belegen.²⁰

In palliativer Indikation werden bei inoperablen, bereits metastasierten STS Chemotherapeutika routinemäßig eingesetzt. Mittel der Wahl sind hier Doxorubicin, Ifosfamid und Dacarbazin in sequentieller Monotherapie. Die erreichten Remissionsraten für diese Substanzen sind mit 15-30% gering. Durch Kombinationstherapien können zwar etwas höhere Remissionsraten erreicht werden, eine Verbesserung des Gesamtüberlebens,

welches in diesem Krankheitsstadium durchschnittlich lediglich 12 Monate beträgt, ist wiederum nicht gesichert.^{5,16}

1.1.2.2 Zielgerichtete Therapie

Anders als Zytostatika, die sich gegen schnell teilende Zellen richten, blockieren zielgerichtete Therapien spezifische molekulare Targets auf Tumorzellen.

In diesem Zusammenhang wurden für einzelne Subentitäten von STS Targets für zielgerichtete Therapien identifiziert. Bekanntestes ist dabei die Rezeptor-Tyrosinkinase KIT (CD117). Bei den meisten gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), einer von mesenchymalen Stammzellen des Gastrointestinaltrakts abstammenden Subentität, liegt eine Mutation im codierenden Protoonkogen c-Kit vor. Diese führt zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des KIT-Proteins und somit zur unkontrollierten Zellproliferation. Bei diesen Tumoren wird der Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Imatinib, der kompetitiv die Autophosphorylierung von KIT und *Platelet Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR) alpha hemmt, therapeutisch eingesetzt. Imatinib ist neoadjuvant zur Tumorreduktion, bei Hochrisiko-Tumoren adjuvant, sowie bei bereits metastasierten, nicht resektablen GIST als Monotherapie indiziert.^{16,21} Durch die Zulassung des Wirkstoffs konnte die Behandlung revolutioniert werden. Verweij et. al. beschreiben 2-Jahres Gesamtüberlebensraten von 74% bei bereits metastasierten GIST, während mit Hilfe des ursprünglich verwendeten Doxorubicins nur Raten von 20% erreicht werden konnten.²²

Außerdem ist der Multikinase-Inhibitor Pazopanib zur Behandlung von STS zugelassen. Dessen Anwendung führt bei Patienten mit bereits metastasierten Leiomyosarkomen und Synovialsarkomen zu einer Verlängerung des medianen progressionsfreien Überlebens um einige Monate. Für andere Entitäten wie Liposarkome und GIST ist Pazopanib hingegen wirkungslos.²³

1.2 Immuntherapie

Aus dem vorigen Kapitel geht hervor, dass sich die erfolgreiche Behandlung von STS schwierig gestaltet und weitere Therapiemöglichkeiten notwendig sind. In diesem Kapitel werden die wichtigsten Aspekte der Immuntherapie, die neben Chirurgie, Chemotherapie und Bestrahlung eine neue Säule der Onkologie und Thema dieser Arbeit ist, vorgestellt.

1.2.1 Grundlagen

Grundlage der Immuntherapie ist die Beobachtung, dass das Immunsystem nicht nur Pathogene, sondern auch körpereigene, entartete Zellen erkennen und zerstören kann. Durch diese Immunüberwachung (Immunosurveillance) wird die Entwicklung einer manifesten Krebserkrankung verhindert. Die Immunosurveillance beschreibt jedoch nur einen Teilaspekt der Interaktion von Immunsystem und Tumorerkrankung, da der Schutz des

Immunsystems vor der Entstehung von Krebserkrankungen offensichtlich nicht vollständig ist. Tumorzellen erwerben, um überhaupt zu einer manifesten Tumorerkrankung führen zu können, Eigenschaften, um der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen. Insofern „formt“ das Immunsystem des Körpers auch entstehende Tumorzellen – ein Prozess, der als Immunoediting bezeichnet wird. Man unterteilt diesen in die drei aufeinander folgenden Phasen Elimination, Equilibrium und Escape.²⁴

Die Eliminationsphase deckt sich mit der Immunüberwachung. Aufgrund ihrer Entartung selbst oder infolge von Zellstress im Rahmen des Tumorwachstums exprimieren Tumorzellen verschiedene Liganden, die von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Die Immunzellen, darunter auch NK-Zellen, sezernieren darauf Interferon-(IFN)- γ . Hierdurch wird eine Chemokin-Kaskade ausgelöst die zur Rekrutierung weiterer NK-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs), sowie zur Blockierung der Neovaskularisation im Tumorgewebe führt. NK-Zellen und Makrophagen sind bereits in der Lage einige Tumorzellen zu zerstören. DCs präsentieren prozessierte Tumorantigene aus toten Tumorzellen im drainierenden Lymphknoten und induzieren somit dort die Bildung von Tumor-spezifischen T-Zellen. Diese sind wiederum in der Lage Antigen-exprimierende Tumorzellen zu eliminieren. Kommt es im Zuge dessen zur vollständigen Zerstörung der Tumorzellen ist die Eliminations-Phase erfolgreich abgeschlossen.²⁴

Beim Überleben eines Teils der Tumorzellen geht der Prozess in die Equilibriums-Phase über. Diese kann über Jahre andauern. Es kommt zu einem dynamischen Gleichgewicht bei dem die Immunzellen nicht in der Lage sind die Tumorzellen vollständig zu eliminieren. Durch hohe Teilungs- und Mutationsraten kommt es zu einem Selektionsprozess bei dem mutierte Tumorzellen mit herabgesetzter Immunogenität entstehen. Diese können beispielweise immunsuppressive Zytokine sezernieren, Tumorantigene auf ihrer Zelloberfläche herunterregulieren oder den Fas-Liganden, welcher bei Lymphozyten Apoptose-induzierend wirkt, exprimieren. Aufgrund solcher Fähigkeiten haben sie einen Überlebensvorteil gegenüber den übrigen Tumorzellen. Schließlich kommt es durch weitere Mutationen zur Entstehung von Tumorzellen, die sich der Immunabwehr vollends entziehen können und sich ungehindert vermehren (Immun-Escape). Das Immunsystem modelliert somit einen Tumor den es alleine nicht mehr kontrollieren kann.^{24,25}

Ziel der Immuntherapie ist es nun das Immunsystem so zu unterstützen beziehungsweise zu stimulieren, dass es Krebszellen, die im Zuge des Immunoeditings resistent geworden sind, wieder erkennen und eliminieren kann. Verschiedene Konzepte dafür werden unter Punkt 1.2.3 vorgestellt.

1.2.2 Historie

Als Pionier der Immuntherapie gilt der amerikanische Arzt William Coley. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts verwendete er eine Endotoxin-haltige Mischung aus abgetöteten Bakterien

der Stämme *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* zur Behandlung von Patienten mit Sarkomen. Er konnte damit beachtliche Therapierfolge erzielen. Als Wirkmechanismus seines „Coley’s Toxin“ wird die Induktion einer Zytokin-Kaskade, welche eine spezifische und unspezifische Immunantwort auslöst, vermutet. Aufgrund des Erfolgs der aufkommenden Strahlentherapie und Fortschritten bei Zytostatika, geriet die retrospektiv betrachtet erste Tumorimmuntherapie in Vergessenheit.^{26,27}

In den 1950er Jahren formulierten Frank Burnet und Lewis Thomas ihre Hypothese zur Immunosurveillance, der auch heute noch, wenngleich in modifizierter Form, große Bedeutung beigemessen wird.²⁴

Der Durchbruch in der Immuntherapie gelang durch die Entdeckung des, traditionell als Tuberkuloseimpfstoff genutzten, BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) zur Behandlung des Urothelkrazinoms der Blase. Der Kanadier Alvaro Morales injizierte BCG erstmals Ende der 1970er Jahre intravesikal, was zu einem deutlich verbesserten Krankheitsverlauf führte. Durch die Applikation konnte mit Hilfe von Pathogenen eine Steigerung der Immunantwort gegen das Tumorgewebe hervorgerufen werden. Dabei werden das angeborene und erworbene Immunsystem unabhängig von Tumorantigenen stimuliert. Durch diesen Erfolg rückte die Immuntherapie wieder in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Die intravesikale BCG-Applikation ist heute noch Teil der Standardtherapie beim oberflächlichem Harnblasenkarzinom.²⁸

1.2.3 Konzepte

In der modernen Immuntherapie gibt es verschiedene Möglichkeiten das Immunsystem zur Tumorbekämpfung zu stimulieren. Man unterscheidet hier zwischen passiver und aktiver Immuntherapie. Erstere umfasst die Therapie mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA), die in dieser Arbeit noch genauer vorgestellt wird, sowie den adoptiven T-Zell-Transfer. Bei diesem werden autologe T-Zellen *ex vivo* mit tumorantigenspezifischen Rezeptoren oder chimären Antigenrezeptoren (CAR) ausgestattet und dem Patienten anschließend wieder verabreicht.²⁹ Außerdem kann das Immunsystem durch die Nutzung von Zytokinen und Interferonen unspezifisch stimuliert werden.

Bei aktiver Immuntherapie wird ebenfalls zwischen spezifischer und unspezifischer Therapie unterschieden. Durch Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Anti-PD-1/PD-L1 Antikörper wird das Immunsystem durch die Verhinderung einer T-Zell-Inaktivierung selektiv stimuliert. Diese spezifische Therapie ist unter anderem zur Behandlung von Melanomen zugelassen.³⁰ Beispiel für eine unspezifische Therapie, bei der es zu einer generellen Stimulation des Immunsystems kommt, ist die bereits beschriebene intravesikale BCG-Applikation bei Urothelkarzinomen.

1.3 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen bilden eine Lymphozyten-Subpopulation, die circa 10-15% der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten ausmacht. Morphologisch handelt es sich größtenteils um große, granulierte Lymphozyten. Immunphänotypisch lassen sie sich durch die Abwesenheit von CD3 von T-Zellen abgrenzen. Zusätzlich exprimieren sie CD16 und CD56 auf ihrer Oberfläche. Anhand des Ausmaßes ihrer CD56 Expression werden sie in zwei Subpopulationen unterteilt. CD56^{dim}-Zellen, welche 90% der NK-Zellen im peripheren Blut repräsentieren, haben eine hohe Zytotoxizität, während die CD56^{bright}-Population sich durch vermehrte Zytokinproduktion auszeichnet. Als Zellen des angeborenen Immunsystems sind NK-Zellen von großer Bedeutung bei Immun- und Tumorabwehr.^{31,32}

1.3.1 Physiologische Funktion

NK-Zellen spielen diesbezüglich eine wichtige Rolle in der Erkennung und Elimination von entarteten und virusinfizierten Zellen. Tumorzellen werden dabei, anders als zum Beispiel durch Zellen des adaptiven Immunsystems, nicht über Expression tumorspezifischer (Neo)-Antigene, sondern über die Expression Zellstress-induzierter Oberflächenmarker erkannt.³² Neben ihrer Funktion bei der Kontrolle der Entartung eines Primärtumors, welche in Kapitel 1.2.1 beschrieben wird, eliminieren sie auch zirkulierende Tumorzellen und sind damit an der Verhinderung von Metastasen maßgeblich beteiligt. Schon vor mehr als 30 Jahren konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass es nach Injektion von Tumorzellen bei Tieren deren NK-Zellen mittels eines Antikörper geblockt wurden, deutlich schneller zur Entwicklung von Metastasen kam, als bei Tieren mit normaler NK-Zell-Funktion.³³

1.3.1.1 Aktivierung

Um eine Tumorzelle eliminieren zu können muss eine NK-Zelle zunächst aktiviert werden. Hierbei kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel verschiedener aktivierender und inhibierender Rezeptoren und Liganden.

NK-Zellen können gesunde, körpereigene Zellen anhand ihrer konstitutionellen major histocompatibility complex (MHC) Klasse I-Expression von infizierten oder entarteten Zellen unterscheiden. Dabei erkennen inhibierende NK-Zell-Rezeptoren der *killer-immune-like receptors* (KIR) Familie und NKG2A humanes Leukozytenantigen (HLA; MHC I) auf der möglichen Zielzelle. Durch Bindung entsteht ein starkes inhibitorisches Signal, welches die Aktivierung der NK-Zelle, und damit die Zerstörung der MHC I-exprimierenden Zelle verhindert.³⁴ Im Zuge der Entartung von Zellen kommt es zu einer Verminderung der MHC I-Expression.³⁵ Dies führt zum Verlust des inhibitorischen Signals was, nach der *Missing-self-Hypothese*, in der Aktivierung der NK-Zelle und Zerstörung der Tumorzelle resultiert.³⁶ Oftmals reicht das in dieser Hypothese ausschlaggebende Fehlen von MHC I auf Zielzellen

alleine nicht aus und es ist zusätzlich noch ein aktivierendes Signal notwendig, um NK-Zellen zu aktivieren.

Die bekanntesten aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen sind NKG2D und die Gruppe der natural cytotoxicity receptors (NCRs). Von den drei bekannten NCRs werden NKp30 und NKp46 konstitutiv exprimiert. NKp44 ist nur auf bereits aktivierten NK-Zellen zu finden.³¹ Als tumorzellassoziierte Liganden der NCR-Rezeptoren sind bisher *HLA-B-associated transcript 3* (BAT3), B7-H6 und NKp44L identifiziert.^{37,38} Bei den Liganden von NKG2D handelt es sich um *MHC class I chain-related proteins A/B* (MICA /MICB) und die Familie der *UL16 binding proteins* (ULBP). Diese werden von Zellen verschiedener Tumorentitäten wie Melanomen, Neuroblastomen und Lymphomen exprimiert.³⁹ In der Regel kommt es durch Bindung von Rezeptor und Ligand zu einem aktivierenden Signal, welches unter der Voraussetzung, dass inhibitorische Signale nicht überwiegen, die NK-Zelle aktiviert.

Ist die NK-Zelle einmal aktiviert kann sie die Zielzelle mittels Ausschüttung der Proteine Perforin und Granzyme lysieren. Alternativ kann durch Bindung von Liganden an die Zielzelle der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert werden. Bekannte Liganden auf NK-Zellen mit dieser Funktion sind *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und *Fas ligand* (FasL).³¹

1.3.1.2 Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)

Neben dem in 1.3.1.1 beschriebenen Weg können NK-Zellen auch mittels des ADCC-Mechanismus aktiviert werden. Voraussetzung dafür ist, dass ein Antikörper ein Antigen der Zielzelle gebunden hat. NK-Zellen können mit ihren Fcγ-Rezeptoren an den Fc-Teil - der konstanten und für die Interaktion mit Effektorzellen verantwortlichen Region - von IgG-Antikörpern binden. Wichtigster Fcγ-Rezeptor auf NK-Zellen ist bei diesem Vorgang FcγIIIA (CD16). Bei erfolgreicher Bindung kommt es aufgrund eines aktivierenden Signals zur Lyse der Zielzelle mittels Ausschüttung von Perforin und Granzyme durch die NK-Zelle. Zusätzlich kommt es zu einer weiteren Immunaktivierung durch IFN-γ-Freisetzung.^{40,41}

Dieser Prozess bildet eine der Grundlagen der Immuntherapie von Krebserkrankungen mit monoklonalen Antikörpern. Für diese Arbeit ist er besonders relevant, da die ADCC-vermittelte Lyse von STS-Zelllinien durch NK-Zellen untersucht wird.

1.3.1.3 Stimulation durch Interleukine

NK-Zellen können durch verschiedene Zytokine stimuliert werden. Eine besondere Stellung nehmen hier die Interleukine ein. Diese sind Peptidhormone, welche die Immunreaktion regulieren. Phillips et. al. zeigten 1987, dass die Behandlung mit rekombinantem Interleukin 2 (IL-2), welches physiologischerweise von T-Helfer-Zellen bei der Immunantwort sezerniert wird, zu einer *in vivo*-Aktivierung von NK-Zellen führt.⁴² Inzwischen konnte auch nachgewiesen werden, dass es nach Inkubation von NK-Zellen mit IL-2 zu einer

Hochregulation u.a. der aktivierenden Rezeptoren NKG2D und NKp30 kommt.^{43,44} Weiter wird der auf unstimulierten beziehungsweise nicht aktivierten NK-Zellen nicht exprimierte Rezeptor NKp44 induziert.³¹ Neben IL-2 wirken auch IL-12 und IL-15 aktivierend und Zellproliferations-stimulierend auf NK-Zellen, sowie hochregulierend auf ihre aktivierenden Rezeptoren.⁴⁵ Zusätzlich zur direkten intravenösen und subkutanen Gabe von Interleukinen zur Immunstimulation sind in den letzten Jahren auch Konzepte zur *ex vivo*-Stimulation von NK-Zellen untersucht worden.⁴⁶ Koinkubation mit IL-2 zeigte sich dabei als erfolgsversprechender Ansatz zur Expansion und damit zur Gewinnung von hohen Zellzahlen aktivierter NK-Zellen. Mittels dafür optimierter Langzeitkultursysteme lassen sich Zellzahlen, die dem hundertfachen des Ausgangswert entsprechen, gewinnen.⁴⁷

1.3.2 Funktion bei Patienten mit Krebserkrankungen

Eine Dysfunktion von NK-Zellen ist bei verschiedenen Krebserkrankungen bekannt. Eine reduzierte lytische Aktivität sowie eine veränderte Expression aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen wurde unter anderem bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen⁴⁸, Ewing-Sarkomen⁴⁹, Zervixkarzinomen⁵⁰ und bei akuter myeloischer Leukämie (AML)⁵¹ festgestellt. Bücklein et. al. konnten dies in einer kürzlich erschienenen Arbeit auch für STS-Patienten belegen. Hierbei zeigte sich eine deutlich erniedrigte Lyse der Standard-NK-Target Zelllinie K562 durch NK-Zellen von Erstlinienpatienten (Chemotherapie-naiven Patienten) und Zweitlinienpatienten (Patienten die im Rahmen ihrer Erkrankung bereits chemotherapeutisch behandelt wurden). Zusätzlich untersuchte NK-Zellen von Nierenzellkarzinom-Patienten zeigten hingegen mit NK-Zellen gesunder Spender vergleichbare Lysewerte.⁵² Für Pankreaskarzinompatienten⁵³ und interessanterweise auch für die STS-Subentität der GIST ist ebenfalls eine normale NK-Zell Funktion in der Literatur beschrieben.⁵⁴

Insgesamt führen die Beobachtungen zur Folgerung, dass es sich bei der Dysfunktion keineswegs um ein universales Phänomen von Krebserkrankungen handelt. Die Ursache dieser Unterschiede ist nicht geklärt. Möglicherweise spielt die Runterregulation von aktivierenden Rezeptoren dabei eine Rolle. So konnte in der zuvor zitierten Arbeit eine starke Abnahme der NKG2D-Expression, sowie eine Verminderung des Perforingehalts bei NK-Zellen von Zweitlinien STS-Patienten und in geringerem Maße auch bei Erstlinienpatienten nachgewiesen werden.⁵² Weiter zeigen NK-Zellen von AML-Patienten eine verringerte Expression der NCRs.⁵¹ Interessant sind die beobachteten Defekte deshalb, da sie potenziell therapeutisch nutzbar sind.

1.4 GD2-Antigen

Beim GD2-Antigen handelt es sich um ein Gangliosid, das sich aus einem Lipid- und einem Zuckeranteil zusammensetzt. Während ersterer von einem Ceramid gebildet wird, handelt es

sich bei dem Kohlenhydratanteil um eine verzweigte Kette aus Glucose, Galaktose, N-Acetylgalactosamin sowie zwei Molekülen N-Acetylneuraminsäuren (Sialinsäuren). Man spricht deshalb auch von einem Disialogangliosid. Physiologischerweise wird GD2 während der fetalen Entwicklung und bei Erwachsenen auf Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS), sowie geringfügig auf Zellen des peripheren Nervensystems und auf Melanozyten exprimiert.⁵⁵ Dabei ist es überwiegend auf der Zelloberfläche zu finden. Die genaue Funktion von GD2 ist nicht ausreichend geklärt. In einer Studie von Sha et. al. zeigten sich jedoch bei Knockout-Mäusen, deren Gen für das Enzym β -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase (GM2/GD2-Synthase) deaktiviert wurde, kognitive Defizite. Betroffene Tiere waren durch eine verminderte Lernfähigkeit und ein eingeschränktes räumliches Gedächtnis auffällig.⁵⁶ Weiter konnten mit zunehmendem Alter degenerative Veränderungen an Ischias-Nerv, Dorsalganglien und Hinterhorn beobachtet werden.⁵⁷

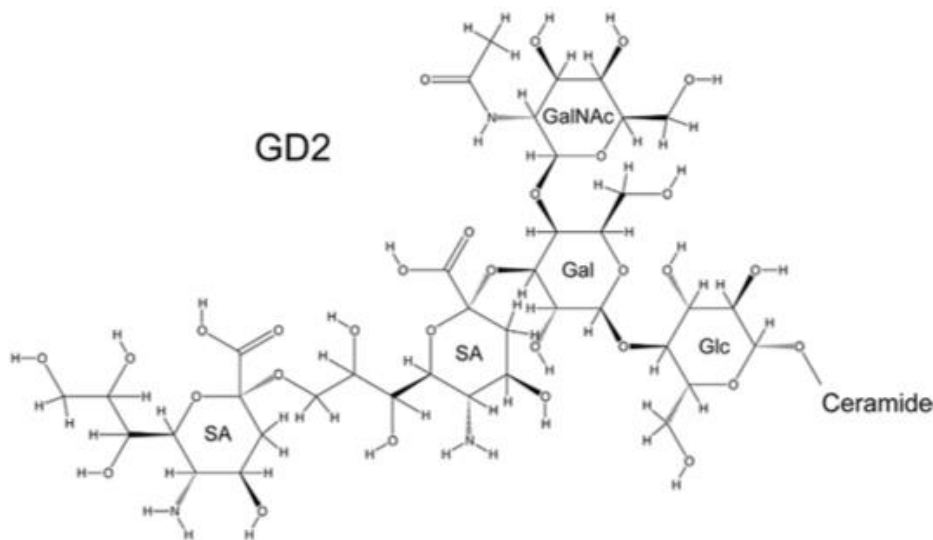


Abbildung 1-1 Chemische Struktur des GD2-Antigens
Modifiziert nach Ahmed et. al.⁵⁸

1.4.1 Rolle als Targetantigen

Zusätzlich wird GD2 auch von verschiedenen Tumorentitäten exprimiert. Eine besonders starke und häufige Expression ist bei Neuroblastomen bekannt.⁵⁹ Zudem findet sich GD2 auf einem signifikanten Anteil von Melanomen, Knochensarkomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC) und auch auf einigen STS-Subtypen.⁵⁸ Eine Expression von GD2 wurde dabei auf Primärmaterial von Liposarkomen, Fibrosarkomen, Leiomyosarkomen und undifferenzierten pleomorphen Sarkomen gefunden.⁶⁰ Aufgrund der vom Zellzyklus unabhängigen und der auf gesundem Gewebe geringfügigen Expression außerhalb des ZNS, sowie der Lokalisation auf der Zelloberfläche eignet es sich gut als Targetantigen für Immuntherapien. 2009 veröffentlichte das *National Cancer Institute* ein Review, in dem alle bis dahin identifizierten Tumorantigene unter anderem anhand ihrer therapeutischen

Funktion, Immunogenität, Onkogenität, Spezifität, Expressionslevel und Lokalisation in eine Rangliste aufgenommen wurden. GD2 wurde dabei auf Rang 12 von 75 als wichtiges Tumorantigen mit hohem Potenzial als Target eingestuft.⁶¹ Die Inzidenz von GD2-positiven Tumoren aller Entitäten wird für die USA auf über 200.000/Jahr geschätzt, wobei 60-100% der betroffenen Patienten potenzielle Kandidaten für eine Anti-GD2 Immuntherapie wären.⁵⁸

1.5 Anti-GD2 Antikörper

In dieser Arbeit wird GD2 als immuntherapeutisches Target für *in vitro*-Versuche mit den Anti-GD2 Antikörpern ch14.18 und ME36.1 genutzt. Präklinische und klinische Daten zu diesen Antikörpern sowie ihre Charakteristika werden im folgenden Kapitel erläutert.

1.5.1 ch14.18

Bei ch14.18 handelt es sich um einen chimärisierten Anti-GD2 Antikörper. Seine variable Region stammt von 14G2a, einem murinen Anti-GD2 Antikörper der Klasse IgG2a, während konstante Region (Fc) von humanem IgG1 gebildet wird. Seine Antigenbindungsstelle (*Complementary Determining Region*, CDR) weist positiv geladene Aminosäuren wie Arginin, Lysin und Histidin auf, welche die negativ geladenen Sialinsäuren des GD2 Antigens ionisch binden können. Die Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen ist mit einer Dissoziationskonstante (K_D) von 77nM mäßig.⁵⁸ Durch den Prozess der Chimärisierung wird allerdings eine sehr hohe Affinität des Fc-Teils des Antikörpers zum FcγRIIIA-Rezeptor erreicht. Diese zeigte sich der humanen IgG-Kontrolle ebenbürtig.⁶² Als Plasmahalbwertszeit von ch14.18 konnte bei der Behandlung von Kindern mit Neuroblastomen ein Wert von 7 Tagen ermittelt werden.⁶³

1.5.1.1 Präklinische Daten

ch14.18 wurde erstmals 1990 von einer Forschergruppe um Ralph A. Reisfeld mittels Hybridom-Technik hergestellt. Sie charakterisierten den Antikörper und verglichen seine Wirksamkeit gegenüber GD2-exprimierenden Melanomen mit der von 14G2a *in vitro* und im Mausmodell. Die Bindungsfähigkeit an das GD2-Antigen auf humanen Xenografttumoren in Mäusen unterschied sich bei den beiden Antikörpern nicht wesentlich. Jedoch konnte durch die Nutzung von ch14.18 eine deutlich erhöhte ADCC-vermittelte Lyse von verschiedenen Melanom-Zelllinien erreicht werden.⁶⁴ Aufgrund dieser Ergebnisse, die bei Neuroblastomen bestätigt werden konnten⁶⁵, wurde der Antikörper schließlich auch in klinischen Studien eingesetzt.

1.5.1.2 Klinische Studien und Zulassung

Bisher sind mehrere klinische Studien zur Immuntherapie mit ch14.18 in der Behandlung von Kindern mit Neuroblastomen veröffentlicht, bei denen jeweils unterschiedliche Kombinationstherapien untersucht wurden.

Als besonders effektiv erwies sich die Kombination von ch14.18 mit IL-2, Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und Isotretinoin. Diese zeigte sich in einer Phase III-Studie mit 226 Patienten der Standardtherapie (Isotretinoin als Monotherapie) überlegen. Eingeschlossen wurden dabei von der *Children's Oncology Group* (COG) als Hochrisiko-Gruppe eingestufte Patienten, die bereits Induktionstherapie, Bestrahlung und autologe Stammzelltransplantation erhalten hatten. Die immuntherapeutische Behandlung wurde in 5 Zyklen zu je 4 Wochen durchgeführt. In jedem Zyklus wurde ch14.18 an vier aufeinander folgenden Tagen mit einer täglichen Dosis von 25mg/m² Körperoberfläche infundiert. Gesamtüberleben und Ereignis-freies-Überleben waren in der Immuntherapie-Gruppe nach zwei Jahren signifikant erhöht. Als Nebenwirkungen von ch14.18 wurden von mehr als der Hälfte der Patienten schwere Schmerzen während und nach der intravenösen Verabreichung angegeben. Des Weiteren kam es in einigen Fällen zu Fieber, Elektrolytveränderungen, Kapillarlecksyndrom, Hypotonie und Überempfindlichkeitsreaktionen.⁶⁶

Unter dem Handelsnamen Unituxin™ (Dinutuximab) wurde ch14.18 in der zuvor genannten Kombinationstherapie von der *Federal Drug Administration* (FDA) und *European Medicines Agency* (EMA) 2015 zur Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen zugelassen.⁶⁷

Des Weiteren wurde 1992 bei Patienten mit Malignem Melanom eine Phase I-Studie durchgeführt. Allerdings konnte bei keinem der 13 Teilnehmer ein Ansprechen des Tumors auf ch14.18 beobachtet werden.⁶⁸

1.5.2 ME36.1

Bei ME36.1 handelt es sich um einen murinen Antikörper der Klasse IgG2a. Dieser bindet mit einer hohen Affinität ($K_D = 19\text{nM}$) an GD2, sowie in geringerem Maße an GD3. Die höhere Affinität zu GD2 im Vergleich zu ch14.18 ist darauf zurückzuführen, dass die CDR von ME36.1 eine stärker positive Ladung aufweist. Da es sich um einen murinen Antikörper handelt, besteht bei der therapeutischen Anwendung die Gefahr der Bildung von humanen Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) durch das Immunsystem des Patienten. Dies führt zu Verzögerungen bei der erneuten Verabreichung des Antikörpers und macht Kontrollen des HAMA-Spiegels im Blut notwendig. Versuche der Humanisierung von ME36.1 scheiterten.⁵⁸

1.5.2.1 Präklinische Daten

Die Wirksamkeit von ME36.1 wurde bereits 1987 *in vitro* erprobt. Es wurde sowohl die ADCC-vermittelte Lyse als auch die Komplementabhängige Zytolyse (CDC) von

verschiedenen Melanom-Zelllinien untersucht. Beide waren in Abhängigkeit der GD2-Expression der Melanom-Zelllinien erhöht.⁶⁹ Es folgten Versuche im Mausmodell. Dabei konnte die Injektion des Antikörpers das Wachstum des Primärtumors und die Metastasierung eines GD2-exprimierenden Melanoms bei athymischen Mäusen hemmen.⁷⁰ Aktuell rekrutieren keine klinische Studien zu ME36.1-basierten Immuntherapien.^{71,72}

2 Fragestellung

Ziel der Dissertation ist die Entwicklung von NK-Zell-basierten Immuntherapien für Patienten mit STS. In vorangegangenen Studien konnte für NK-Zellen dieser Patienten eine Dysfunktion nachgewiesen werden.⁵² Die Reversion dieser Dysfunktion kann einen immuntherapeutischen Behandlungsansatz darstellen. Deshalb fokussiert die vorliegende Arbeit auf Methoden zur Verbesserung der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber STS-Tumorzellen. Hierfür werden ADCC-basierte Therapiestrategien (unter Verwendung von Anti-GD2 Antikörpern) und Strategien zur *ex vivo*-Stimulation und -Expansion von NK-Zellen evaluiert.

Die Hauptfragestellungen lauten:

- Gibt es Unterschiede zwischen NK-Zellen von gesunden Spendern und Patienten mit STS in der Zytotoxizität gegen STS-Zellen?
- Kann die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen STS-Zellen durch anti-GD2 gerichtete Antikörper gesteigert werden?
- Kann eine Interleukin-basierte Expansion und Stimulation die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen STS-Zellen erhöhen?

Basierend auf den oben ausgeführten Überlegungen wurden folgende Hypothesen formuliert:

- NK-Zellen von STS-Patienten haben im Vergleich zu NK-Zellen gesunder Spender eine verminderte Zytotoxizität gegen STS-Zellen
- Sowohl die Nutzung des ADCC-Konzepts als auch eine Interleukin-basierte Expansion können die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen STS-Zellen signifikant erhöhen

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die zur Durchführung der Experimente genutzten Materialien sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

3.1.1 Geräte

Gerät	Produktbezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Model CB150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Durchflusszytometer	LSR II	BD Biosciences, Canaan, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Gammazähler	TopCount NXT	PerkinElmer, Waltham, USA
Hybridisierungskammer	Vysis HYBrite	Abott, Lake Bluff, USA
Kühlschrank	KGT3946	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) -Isolator	MACS Multistand Magnet	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Mikroskop	Telaval 31	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipetboy	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten	Research 10µl Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Research 200µl Pipette	
	Research 1000µl Pipette	
Sterilwerkbank	Laminar-Flow Sicherheitswerkbank Klasse II nach EN12469	Weiss Pharmatechnik GmbH, Sonnenbühl, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	VWB 12	VWR, Radnor, USA
Zellsortiersystem	FACSARIA III	BD Biosciences, Canaan, USA
Zellzähler	Countess Automated Cell Counter	Invitrogen, Eugene, USA
Zentrifuge	Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 3-1 Geräte

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Produktbezeichnung	Hersteller
12-Well-Zellkulturplatten	Nunc Surface 12-Well Kulturplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Platte Gammazähler	LumaPlate Szintillator-beschichtete 96-Well-Platte	PerkinElmer, Waltham, USA
96-Well-Zellkulturplatten	Nunc Surface 96 U-Mikrowellplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Blutentnahmekanüle	Safety Multifly 20G	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Blutentnahmeröhrchen	EDTA-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser	Deckgläser 24 x 55mm Ø10mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland
FACS-Röhrchen	5ml Polystyrene Round Bottom Tubes	Corning Incorporated, Corning, USA
Kryoröhrchen	Nunc Cryotube Vials 1,8ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
NK-Isolation	MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Objektträger	Objektträger, geschliffen 90° mit Mattrand	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Pipettenaufsätze für Pipetboy	CoStar Stripette 2ml CoStar Stripette 5ml CoStar Stripette 10ml CoStar Stripette 25ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Pipettenspitzen	EpT.I.P.S Standard 0,5-10µl EpT.I.P.S Standard 2-200µl EpT.I.P.S Standard 50-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zählkammer	Countess cell counting chamber slides	Invitrogen, Eugene, USA
Zellkulturflaschen	Nunclon Surface 25cm ² Nunclon Surface 75cm ²	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturröhrchen	BD Falcon 15ml BD Falcon 50ml	BD, Biosciences, Canaan, USA
Zellkulturröhrchen - Glas	12 ml cell culture tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 3-2 Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Reagenzien

3.1.3.1 Medien und Chemikalien

Reagenz	Produktbezeichnung	Hersteller
1,4-Diaminobenzol freie Base	DAPI Antifade	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Hepes 1M	Invitrogen, Eugene, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	DAPI-Powder	Roche, Basel, Schweiz
⁵¹ Chrom	[Cr51]Sodium chromate	Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland
Antibiotischer Zusatz für Zellkulturmedien	Pen Strep Glutamine (100x)	Life Technologies Corporation, Grand Island, USA
Bovines Serumalbumin	MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Dimethylsulfoxid	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Ultrapure 0,5M EDTA pH 8,0	Life Technologies Corporation, Grand Island, USA

Fc-Rezeptor Block	MACS FcR Blocking Reagent human	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Fetales Kälberserum	Fetal Calf Serum (FCS)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Formalin	Formaldehyd 37%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kit zur NK-Zell Isolation	MACS NK Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Mycoplasmen Testkit	Mycoplasma PCR Elisa	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Octoxinol 9	Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Separationslösung zur Dichtegradientenzentrifugation	Biocoll	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Sialin-Natrium-Zitrat Puffer (SSC)	SSC Buffer 20x	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Trypanblau 0,4%	Life Technologies Corporation, Grand Island, USA
Trypsin	Trypsin EDTA, 0,05%	Life Technologies Corporation, Grand Island USA
Zellkulturmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies Corporation, Grand Island, USA
Zellkulturmedium	Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Zellkulturmedium	Minimal Essential Medium with Earle's Salts (MEME)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zellkulturmedium	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Tabelle 3-3 Medien, Chemikalien, Reagenzien

3.1.3.2 FACS-Antikörper und Isotypkontrollen

Bezeichnung/Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Menge*	Klon	Hersteller
Anti-human CD16	Allophycocyanin (APC)	2,5µl	3G8	Biolegend, San Diego, USA
Anti-human CD3	Fluorescein isothiocyanat (FITC)	2,5µl	UCHT1	eBioscience, San Diego, USA
Anti-human CD56	Phycoerythrin/Cyanin (PE/Cy5)	2,5µl	MEM-188	Biolegend, San Diego, USA
Anti-human Disialogangliosid GD2	Phycoerythrin (PE)	5µl	14.G2a	BD Biosciences, Canaan, USA
Mouse IgG1 kappa isotype control	FITC	1,25µl	P3.6.2.8.1	eBioscience, San Diego, USA
Mouse IgG1 kappa isotype control	APC	1,25µl	MOPC-21	Biolegend, San Diego, USA
Mouse IgG1 kappa isotype control	PE/Cy5	1,25µl	MOPC-21	Biolegend, San Diego, USA
Mouse IgG2a kappa isotype control	PE	2,5µl	eBm2a	eBioscience, San Diego, USA

Tabelle 3-4 FACS-Antikörper und Isotypkontrollen

*genutzte Menge zur Färbung von je 1 x 10⁶ Zellen

3.1.3.3 Therapeutische Antikörper

Bezeichnung/Spezifität	Klon	Hersteller
ME36.1 Anti-human GD2	Me361-3	Trion Research, Martinsried, Deutschland
ch14.18 Anti-human GD2	14.G2a	Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland

Tabelle 3-5 Therapeutische Antikörper

3.1.3.4 FISH-Sonden

Bezeichnung Sonde	Chromosom	Fluoreszenz	Sondenart	Hersteller
SE 8 (D8Z1) Red	8	rot	CEP	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Vysis CEPX (DXZ1)	X	rot	CEP	Abott, Lake Bluff, USA
Vysis CEPY (DYZ1)	Y	rot	CEP	Abott, Lake Bluff, USA
Vysis LSI21 Spectrum Red	21	rot	LSI	Abott, Lake Bluff, USA
Vysis TP53/CEP17	17	rot/grün	LSI / CEP	Abott, Lake Bluff, USA

Tabelle 3-6 FISH-Sonden

3.1.3.5 Zytokine

Zytokin	Produktbezeichnung	Hersteller
Interleukin 2	Proleukin S rekombinantes humanes Interleukin 2	Novartis, West Sussex Großbritannien
Interleukin 15	Rekombinantes humanes Interleukin 15	Immunotools, Friesoythe, Deutschland

Tabelle 3-7 Zytokine

3.1.4 Zelllinien

Zelllinie	Tumorentität	Kulturmedium*	Herkunft
A673	Rhabdomyosarkom	DMEM	Cell Line Service, Eppelheim, Deutschland
K562	Chronische myeloische Leukämie (CML)	RPMI 1640	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
LAN-1	Neuroblastom	RPMI 1640	Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
LS	Neuroblastom	RPMI 1640	Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
RD-ES	Ewing-Sarkom	RPMI 1640	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
RH-18	Rhabdomyosarkom	RPMI 1640	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
SKUT-1	Leiomyosarkom	MEME	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
SW872	Liposarkom	DMEM	Cell Line Service, Eppelheim, Deutschland

SW982	Synovialsarkom	DMEM	Cell Line Service, Eppelheim, Deutschland
TC-71	Ewing-Sarkom	IMDM	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 3-8 Zelllinien

*alle Kulturmedien wurden für die Zellkultur zusätzlich modifiziert. Zu 500ml Medium wurden jeweils 5ml PenStrep Glutamine, 5ml Hepes und 50ml FCS hinzugegeben.

3.2 Methoden

Im Folgenden werden Durchführung und Versuchsaufbau aller in dieser Arbeit genutzten labortechnischen Methoden im Detail beschrieben.

3.2.1 Patienten- und Spenderproben

Mit Hilfe der Patienten- und Probandeninformation (8.4) wurden potenzielle Teilnehmer im Gespräch über Hintergrund, Ziel und Nutzen der Studie, sowie mögliche Risiken aufgeklärt.

Bei schriftlicher Einwilligung wurden Patienten und gesunden Spendern mittels venöser Punktion 30 bis 40ml Blut entnommen. Die Lagerung der Proben bis zur Weiterverarbeitung am selben Tag im Labor erfolgte bei Raumtemperatur in EDTA-Röhrchen.

Bei den eingeschlossenen Patienten handelt es sich ausschließlich um Erstlinienpatienten (d.h. Patienten mit der (Erst)Diagnose Weichteilsarkom ohne vorausgegangene Chemotherapie), welche am Klinikum Großhadern behandelt wurden.

Bei den gesunden Spendern handelt es sich um Mitarbeiter aus dem Labor der KKG Immuntherapie sowie um Medizinstudierende der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München.

Die hier beschriebenen Blutentnahmen und die Weiterverarbeitung der Proben in *in vitro*-Experimenten wurden von der Ethikkommission der LMU als unbedenklich eingestuft (Projektnummer 408-12).

3.2.2 Isolation von Effektorzellen

Die Isolation von Effektorzellen für die Zytotoxizitätsmessungen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus den Vollblutproben die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) isoliert. In einem zweiten Schritt wurden mittels MACS NK-Zellen aus den PBMCs isoliert.

3.2.2.1 Isolation von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Nach Verdünnung des Vollblutes im Verhältnis 1:1 mit DPBS wurden jeweils 30ml der entstandenen Zellsuspension auf 15ml Biocoll-Separationslösung geschichtet. Daraufhin wurde 30 Minuten (bei Raumtemperatur, 2000rpm, ohne Bremse) zentrifugiert. Durch die hierbei erfolgte Dichtegradientenzentrifugation finden sich die PBMCs in der Interphase zwischen Biocoll-Separationslösung und Plasma. Die Interphase wurde nun vorsichtig abpipettiert und in RPMI 1640 gegeben. Nach Zentrifugation der neuen Suspension für 10

Minuten (1800 rpm, Raumtemperatur), sowie darauffolgendem Entfernen des Überstandes konnten die nun gewonnenen PBMCs auf einer 12-Well-Platte in frischem Kulturmedium aufgenommen und gezählt werden.

3.2.2.2 Isolation von NK-Zellen aus PBMCs mittels MACS

Die Isolation erfolgte nach dem Funktionsprinzip der magnetischen Separation. Bei diesem Prinzip werden T-Zellen, B-Zellen, Stammzellen, Dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und verbliebene Erythrozyten im PBMC-Gemisch indirekt magnetisch markiert. Zu den PBMCs wird ein Biotin Antikörper Cocktail gegeben, welcher an verschiedene, spezifische Oberflächenantigene oben genannter Zellen bindet. Da keines dieser Antigene auf NK-Zellen zu finden ist bleiben sie unmarkiert. Sekundär binden mit magnetischen Microbeads gekoppelte Antikörper an die bereits zellgebundenen Antikörper des Biotin Antikörper Cocktails. Es entsteht somit ein magnetisches Konjugat aus einer Zelle und zwei Antikörpern.

Schließlich läuft das Zellgemisch über eine Magnetsäule. Hierbei können nur unmarkierte NK-Zellen die Magnetsäule passieren und werden somit von den restlichen Bestandteilen des PBMC-Gemisches separiert.

Der Isolationsprozess erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers. Hierbei wurden 1×10^7 abzentrifugierte PBMCs in 40µl DPBS und 10µl Biotin Antikörper Cocktail gelöst. Nach 5-minütiger Inkubation im Kühlschrank wurden weitere 30µl DPBS sowie 20µl NK Cell Microbead Cocktail hinzugegeben. Das Gesamtvolumen wurde auf 500µl mit DPBS aufgefüllt und es erfolgte eine erneute 10-minütige Inkubation im Kühlschrank. Die nun fertige Suspension wurde vorsichtig auf die zuvor angespülte Separationssäule pipettiert, welche am Separationsmagneten befestigt war. Ein darunter angebrachtes Zellkulturröhrchen diente zum Auffangen der isolierten NK-Zellen. Die Separationssäule wurde im Anschluss erneut mit 500µl DPBS gespült. Im Zellkulturröhrchen aufgefangene NK-Zellen wurden in Kultur genommen und gezählt.

3.2.3 Zellkultur

Die Zellkultur-Arbeiten erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank. Die Zelllinien wurde im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop auf ihre Viabilität und etwaige Kontaminationen untersucht. Mycoplasmenbefall wurde regelmäßig alle 3 Monate mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ausgeschlossen. Die zu jeder Zelllinie zugehörigen Kulturmedien können Tabelle 3-6 entnommen werden.

3.2.3.1 NK-Zellen und PBMCs

Sowohl PBMCs als auch aus ihnen isolierte NK-Zellen wurden in der Mehrzahl der Fälle am Tag ihrer Gewinnung für einen Versuch genutzt. Sie wurden deshalb nur vorübergehend in

12-Well-Platten kultiviert. Falls die Weiterverwendung am selben Tag nicht möglich war, wurden die Zellen eingefroren. Bei diesem Vorgang wurden die Zellen für 5 Minuten bei 550G abzentrifugiert und in ein Gefriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO aufgenommen. Aliquots zu 1×10^7 Zellen wurden in ein Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte im Stickstofftank bei -180°C . Zum Auftauvorgang am Versuchstag wurden die Kryoröhrchen in ein Wasserbad (37°C) gegeben. Das nun flüssige Aliquot wurde rasch in ein Zellkulturröhrchen mit Medium aufgenommen, um die DMSO-Zytotoxizität möglichst gering zu halten. Nach Abzentrifugation (5min, 550G, Raumtemperatur) und Verwerfen des Überstands konnten die Zellen wieder in frischem Medium in Kultur genommen werden.

3.2.3.2 Expansion von NK-Zellen

In Kooperation mit Zellwerk GmbH (Oberkrämer, Deutschland) wurden Interleukin-2-basierte Langzeitexpansionen von NK-Zellen durchgeführt. Hierfür wurde von gesunden Spendern jeweils 200ml Vollblut mittels venöser Punktion entnommen und an die Kooperationspartner gesendet. Diese führten mit Hilfe des Z® RP Zellkultivierungs-Systems eine mindestens 21-tägige Expansion durch. Spender-NK-Zellen wurden dabei in MEME Zellkulturmedium mit 10% humanem Serum und 1000IE/ml Interleukin-2 in einem Einweg-Bioreaktor kultiviert. Der Reaktor befand sich währenddessen in einem Inkubator, welcher Sterilität, ausreichende Sauerstoffversorgung, Temperierung und laminare Strömung gewährleistete. Um optimale Bedingungen für die Expansion zu garantieren wurden alle Prozessparameter mittels einer Kontrolleinheit gesteuert und am Computer dokumentiert.⁷³ Weiter sei gesagt, dass es sich hierbei um ein patentiertes Verfahren handelt, sodass die genauen Spezifikationen des Systems sowie etwaige Modifikationen am Kulturmedium nicht bekannt sind.

Nach abgeschlossener Kultivierung wurden die Zellen geerntet und in frischem Medium aufgenommen. Der Rücktransport der entstandenen Suspension erfolgte im Beutelsystem bei 4°C .

Im Labor wurden die Zellen schließlich für Zytotoxizitätsmessungen und durchflusszytometrische Analysen genutzt. Überschüssiges Material wurde kryokonserviert.

3.2.3.3 Tumorzellen

Tumorzellen wurden in 25cm^2 oder 75cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert. Alle Zellkulturen wurden regelmäßig im Abstand von drei bis vier Tagen gesplittet. Versuche mit Tumorzellen wurden stets am dritten Tag nach dem letzten Splitvorgang durchgeführt. Bis auf die erythroleukämische Zelllinie K562 handelt es sich bei allen anderen Tumorzelllinien um adhärenzte Zellen. Um diese Zellen beim Splitvorgang von der Zellkulturflaschenoberfläche zu lösen, wurden sie mit 2ml Trypsin vorbehandelt. Nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Trypsin-Wirkung mittels Zugabe von Medium abgestoppt. Die Zellen konnten nun je nach Zellzahl im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in neuen Zellkulturflaschen mit

zusätzlichem Medium aufgenommen werden. Das Einfrieren und Auftauen von Tumorzellen erfolgte analog zum Vorgang bei PBMCs und NK-Zellen.

3.2.4 Zellzählung

20µl der zu zählenden Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt. Die Hälfte der entstandenen Suspension wurde auf die Zählkammer pipettiert. Diese wurde wiederum in den Zellzähler gegeben, welcher sowohl Zellzahl als auch Viabilität der Zellen bestimmte.

3.2.5 Durchflusszytometrie

Ziel der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen ist die Charakterisierung ihrer Größe, Granularität und ihres Oberflächenantigenprofils. Hierbei werden die Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch das Licht eines Lasers geführt. Bei der Passage der Zelle durch den Laserstrahl entsteht Streulicht. Das Streulicht wird von zwei im rechten Winkel zueinander stehenden Detektoren eingefangen. Dort erfolgt die Umwandlung des Lichtsignals in ein Spannungssignal. Licht welches in Richtung des Laserstrahls gestreut wird bezeichnet man als Forwardscatter (FSC). Es ist ein Maß für die Größe der Zelle. Das senkrecht zum Laser eingefangene Streulicht beschreibt die Granularität der Zelle. Man bezeichnet es auch als Sidescatter (SSC). Durch Messung dieser Parameter ist es bereits teilweise möglich Subsets von Immunzellen des Blutes zu unterscheiden. Beispielsweise haben Granulozyten, aufgrund ihrer rauen Oberfläche und ihrem Reichtum an Vesikeln im Zellinneren, eine höhere Granularität als glatte T-Zellen. Sie zeigen deshalb eine stärkere Streuung im Sidescatter und kommen in einer zweidimensionalen Darstellung weiter entfernt vom Ursprung des Diagramms zur Darstellung.

Zusätzlich können Zellen, beziehungsweise ihre Oberflächenantigene mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert werden. Somit kann eine Aussage bezüglich der quantitativen Expression besagter Antigene getroffen werden. Wenn die markierte Zelle hierbei den Laser passiert, absorbieren Fluorochrome einen Teil des Lichts und geben es als für ihren jeweiligen Farbstoff spezifisches Fluoreszenzlicht wieder ab. Das abgegebene Licht wird von einer Linse gebündelt, von dichroitischen Spiegeln in die jeweiligen Wellenlängen der einzelnen Fluorochrome aufgeteilt und gelangt so zum zugehörigen Detektor. Da sich die Wellenlängenbereiche einzelner Fluorochrome teilweise überlappen, kann es zur Verfälschungen der Messungen kommen. Um dies zu verhindern, muss vor der ersten Messung mit mehreren Fluorochromen eine Kompensation erfolgen. Hierfür wird pro Fluorochrom eine Kontrollprobe hinzugefügt, welche es ermöglicht den überlappenden Anteil aus dem eigentlich zu detektierenden Fluoreszenzsignal herauszurechnen.

In dieser Arbeit wurden Sarkom-Zelllinien auf ihre Expression des GD2-Oberflächenantigens untersucht, sowie NK-Zellen gesunder Spender und Patienten auf die Expression der Marker CD3, CD16 und CD56.

3.2.5.1 Oberflächenmarkerfärbung

Vor der Messung am Zytometer wurden die Oberflächenantigene auf den zu untersuchenden Zellpopulationen mittels direkter Färbung markiert. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen in zwei FACS-Röhrchen gegeben. Nach Zentrifugation, welche bei allen Schritten der Oberflächenmarkerfärbung für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 550G erfolgte, und Verwerfen des Überstandes wurden jeweils 10µl FcR-Blocking Reagent dazu pipettiert. Hierdurch wird eine unspezifische Bindung der später zugegebenen Antikörper an Fc-Rezeptor exprimierende Zellen verhindert. Es folgte eine 15-minütige Inkubationszeit im Kühlschrank. Im nächsten Schritt wurden die beiden FACS-Röhrchen mit 3ml FACS-Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden jeweils 100µl FACS-Puffer dazugegeben. In das erste Röhrchen wurden nun die für den Versuch gewünschten Antikörper in empfohlener oder gegebenenfalls selbst austitrierter Menge pipettiert (Vgl. Kapitel 4.3.1). In das zweite Röhrchen wurden die zugehörigen Isotypkontrollen in vergleichbarer Menge zu den Antigen-spezifischen Antikörpern pipettiert. Bei diesen handelt es sich um Negativkontrollen, die das Ausmaß an Hintergrundsignal des Antikörpers aufzeigen sollen. Nach gründlichem Vortexen der Röhrchen erfolgte eine erneute Inkubation im Kühlschrank für 25 Minuten. Im Anschluss wurden die Röhrchen mit jeweils 1ml FACS-Puffer aufgefüllt und ein letztes Mal zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde in jedes Röhrchen 100µl FACS-Fix pipettiert. Das Formaldehyd-haltige FACS-Fix ermöglicht eine Lagerung der Proben zwischen Oberflächenmarkerfärbung und Messung am Durchflussszytometer von bis zu drei Tagen.

Die Zusammensetzung von FACS-Puffer und FACS-Fix sind Tabelle 3-9 zu entnehmen. Tabelle 3-4 zeigt eine detaillierte Übersicht zu genutzten Mengen und Fluorochromen von Antikörpern und Istotypkontrollen.

Die Messung der Proben erfolgte am LSR-II-Durchflussszytometer mit Hilfe der Software BD FACS Diva Version 4. Zur Auswertung wurde die Software FlowJo Version 9.7.6 genutzt.

Reagenz	Menge
BSA	2,5ml
DPBS	500ml
EDTA	2ml
Formaldehyd (Zugabe nur bei FACS-Fix)	27ml

Tabelle 3-9 Zusammensetzung FACS-Puffer und FACS-Fix

3.2.6 ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay

Ziel des ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assays ist es die lytische Aktivität von Effektorzellen gegenüber Ziel-(Target-)zellen zu messen. Die im Assay gemessene lytische Aktivität ist

also ein Maß für die Zytotoxizität von immunkompetenten Zellen, insbesondere von T- und NK-Zellen. In dieser Arbeit dienten die Sarkom-Zelllinien SW872, TC-71 und SKUT-1, sowie die erythroleukämische Zelllinie K562 als Targetzellen. Als Effektorzellen wurden NK-Zellen gesunder Spender und von Sarkompatienten genutzt.

Das Funktionsprinzip des Assays beruht auf der Tatsache, dass Targetzellen während der Inkubation $^{51}\text{Chrom}$ in ihr Zellinneres aufnehmen. Bei der späteren Koinkubation mit den Effektorzellen wird $^{51}\text{Chrom}$ aus lysierten Targetzellen frei und somit im Überstand messbar. Intakte Targetzellen geben kein $^{51}\text{Chrom}$ ab. Mittels des Gammazählers kann die γ -Strahlung des freigesetzten $^{51}\text{Chroms}$ im Überstand als Maß für die Effektorzell-induzierte Lyse bestimmt werden. Je mehr γ -Strahlung messbar ist, desto höher ist die lytische Aktivität. Zusätzlich werden Spontanlyse und Maximallyse bestimmt. Bei ersterer handelt es sich um die γ -Strahlung im Überstand einer Probe, die nur Targetzellen enthält, und ist damit ein Maß für den Effektorzell-unabhängigen Zerfall von Targetzellen. Letztere ist die maximal mögliche Lyse, also die gemessene γ -Strahlung aller (nicht lysierten) Targetzellen einer Probe. Durch Berechnung mit folgender Formel lässt sich aus diesen drei Werten die bereinigte, spezifische Lyse ermitteln.

$$\text{spezifische Lyse (\%)} = \frac{\text{Effektorzell induzierte Lyse} - \text{Spontanlyse}}{(\text{Maximallyse} \div 2) - \text{Spontanlyse}} \times 100$$

Formel 1 Berechnung der spezifischen Lyse (%) beim $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assay

3.2.6.1 Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen

Bei der Durchführung des $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assays wurden zunächst die Targetzellen mit $^{51}\text{Chrom}$ markiert. Hierzu wurden in einem gläsernen Zellkulturröhrchen $1,8 \times 10^6$ Zellen in 100 μl FCS aufgenommen. Danach wurden 100 μCi $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ hinzugegeben. Es folgte eine 90-minütige Inkubation im Brutschrank (37°C , 5% CO_2), in der die Targetzellen das $^{51}\text{Chrom}$ aufnehmen konnten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimalig mit 5ml Zellkulturmedium gewaschen, um das nicht aufgenommene $^{51}\text{Chrom}$ aus dem Überstand zu entfernen. Durch erneute Zugabe von Zellkulturmedium wurden die Targetzellen auf eine Konzentration von $4 \times 10^4/\text{ml}$ gebracht. Je nach Versuchsbedingung wurde zusätzlich Anti-GD2-Antikörper in gewünschter Konzentration dazu pipettiert.

Die Effektorzellen wurden zunächst, wie in 3.2.2 beschrieben, aus Vollblut isoliert oder alternativ, nach 3.2.3.1, aufgetaut. In einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ wurden 100 μl der Zellsuspension in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Durch initiale Weitergabe von 50 μl Zellsuspension vom ersten ins zweiten Triplikat und wiederholter 1:1-Verdünnung mit Kulturmedium des zweiten und aller folgenden Triplikate wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Im nächsten Schritt wurden 50 μl der Targetzell-Suspension (in oben genannter Konzentration) addiert. Es ergaben sich daraus Effektor-zu-Target-(E/T)-Ratios von 50:1,

25:1, 12,5:1 und 6,25:1. Zusätzlich wurden zwei Triplikate aus 50µl Kulturmedium und 50µl Targetzellen hergestellt um die Spontanlyse zu bestimmen. Weitere zwei Triplikate aus 50µl Targetzellen wurden direkt auf eine Lumaplatte pipettiert um später die Maximallyse bestimmen zu können.

Die 96-Well-Platte wurde anschließend zur Inkubation für 4 Stunden in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gegeben. Während der nun erfolgenden Lyse sinken zerstörte und intakte Targetzellen sowie Effektorzellen auf den Boden des Wells und bilden ein Pellet. Freigesetztes ⁵¹Chrom befindet sich im Überstand.

Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Hälfte des Überstandes aller Triplikate (50µl) auf die Lumaplatte pipettiert. Diese wurde über Nacht unter dem Abzug getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Messung der γ-Strahlung aller Wells der Lumaplatte durch den Gammazähler.

Die Messwerte der jeweiligen Triplikate wurden gemittelt. Aus den Mittelwerten wurde anhand von Formel 1 die spezifische Lyse in Prozent ermittelt. Hierfür wurde die Software Microsoft Excel 2011 genutzt. Versuche wurden nur in die Auswertung aufgenommen, wenn die Spontanlyse weniger als 20% der Maximallyse betrug.

3.2.7 Fluoreszenz-Aktivierte Zellsortierung

Ziel der Fluoreszenz-Aktivierten Zellsortierung, einer speziellen Form der Durchflusszytometrie, ist es Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität oder, wie in dieser Arbeit, dem Vorhandensein eines Oberflächenantigens aufzutrennen. Wie auch für die Durchflusszytometrie werden die zu untersuchenden Zellen, beziehungsweise ihre Antigene mittels eines Fluorochrom-gebundenen, antigen-spezifischen Antikörpers markiert. Die markierten Zellen werden in einem FACS-Röhrchen in das Zellsortiersystem gegeben. Hier wird das Zellgemisch durch Druckluft angepresst und zu einer Düse transportiert. Es entsteht ein dünner Flüssigkeitsstrahl, in dem die Zellen einzeln, hintereinander einen Laser passieren. Hierbei kommt es wiederum zur Absorption des Laserlichtes und anschließender Emission eines Farbstoff-spezifischen Lichtsignals durch das Fluorochrom. Bei der anschließenden hydrodynamischen Fokussierung werden die Zellen durch einen Vibrator einzeln in Tropfen verpackt und in Abhängigkeit ihrer Fluoreszenz mit einer negativen oder positiven elektrischen Ladung versehen. Sie passieren danach ein elektrisches Feld in dem sie in entsprechend ihrer Ladung, beziehungsweise der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Fluorochroms, in zwei verschiedene Auffangröhrchen abgelenkt werden.

3.2.7.1 GD2-basierte Sortierung von Sarkomzellen

Die zu sortierenden Zellen der Liposarkom-Zelllinie SW872 wurden nach den Vorgaben der Oberflächenmarkerfärbung (Kapitel 3.2.5.1) mit dem PE-konjugierten Anti-GD2 Antikörper

gefärbt. Hierbei wurden, gemäß den Herstellerangaben, 5µl Antikörper pro 1×10^6 Zellen genutzt. Insgesamt wurden 2×10^7 Zellen mit insgesamt 100µl Antikörper zur Sortierung markiert. Die Herstellung eines zweiten Ansatzes für die Isotypkontrolle war bei diesem Versuch nicht notwendig. Die Sortierung erfolgte am Zellsortiersystem BD FACSAria III. Zunächst erfolgte eine durchflusszytometrische Messung der GD2-Expression der Ausgangszelllinie, anhand derer die Gates für die Sortierung (Abbildung 3-1) festgelegt wurden. Als Gates wurden hierbei Bereiche im Histogramm definiert, die eine bestimmte PE-Fluoreszenzintensität zeigten. Um die Reinheit der sortierten Populationen möglichst hoch zu halten, wurden diese so gewählt, dass nur stark GD2-positive, sowie GD2-negative Zellen gesammelt werden konnten. Zellen, die sich nicht innerhalb eines der beiden Gates befanden wurden beim darauffolgenden Sortiervorgang im elektrischen Feld nicht ausgelenkt und abgesaugt. Aufgrund dieses restriktiven Gatings kam es zu einem Verlust von circa 80 Prozent der Zellen der Ausgangspopulation. Die beiden sortierten Subpopulationen wurden im Anschluss mittels durchflusszytometrischer Messung am Zellsortiersystem auf Reinheit bezüglich ihrer GD2-Expression geprüft und jeweils in Langzeitkultur aufgenommen.

SW872 Liposarkom
Gating vor GD2-basierter Sortierung

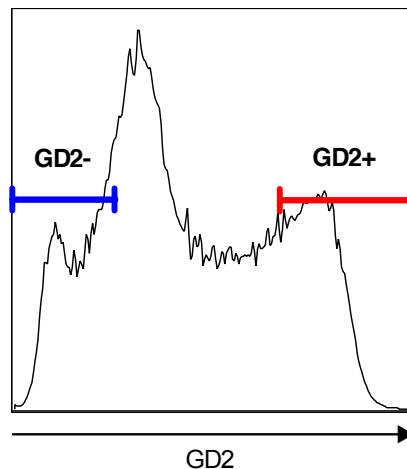


Abbildung 3-1 Gatingstrategie zur GD2-basierten Sortierung von SW872
Darstellung im Histogramm: Blau = Gate für GD2-negative Zellpopulation; Rot = Gate für GD2-positive Zellpopulation

3.2.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die in-situ Hybridisierung wurde 1969 von Mary Lou Pardue und Joseph G. Gall entwickelt.⁷⁴ Mit diesem Verfahren kann DNA aus Metaphase-Chromosomen mittels Nukleinsäure-Sonden, welche mit radioaktivem Tritium markiert sind, nachgewiesen werden. Die Bindung dieser synthetisch hergestellten Sonden an die DNA der Chromosomen erfolgt durch komplementäre Basenpaarung. Da die chromosomale DNA hierfür als Einzelstrang vorliegen muss, wird der DNA-Doppelstrang zuvor denaturiert. Man bezeichnet den Schritt der Bindung von Sonde an DNA als Hybridisierung. Der Zusatz „in-situ“ kommt daher, dass der

Vorgang nicht in einem Reagenzglas, sondern direkt am Primärmaterial auf einem Objektträger erfolgt. Nach erfolgter Hybridisierung werden die Präparate zur Auswertung auf einen Röntgenfilm gelegt. Somit können durch verschiedene Arten von spezifischen Sonden sowohl einzelne Gene, als auch die Anzahl ganzer Chromosomen einer Zelle bestimmt werden.

Bei der heute größtenteils genutzten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung werden anstelle radioaktiv markierter Sonden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sonden genutzt. Dieses Verfahren hat viele Vorteile. Neben der Vermeidung von radioaktiver Strahlung und besserer räumlicher Auflösung ist es durch die Nutzung verschiedener Farbstoffe möglich, mehrere Gene oder Chromosomen auf einem Präparat gleichzeitig nachzuweisen. Die genaue Durchführung des Verfahrens wird im folgenden Unterpunkt erläutert.

3.2.8.1 Vergleich von Sarkomzell-Subpopulationen mittels Nachweis numerischer chromosomaler Aberrationen

In dieser Arbeit wurden die Anzahl der Chromosomen 8, 17, 21 und X, Y auf den, mittels GD2-basierter Sortierung entstandenen, Subpopulationen der Liposarkom-Zelllinie SW872 bestimmt. Für die Ausgangszelllinie sind Polyploidien der drei Autosomen, sowie das genetische Geschlecht bekannt. Auf Grundlage dessen sollten beiden Subpopulationen hinsichtlich möglicher Unterschiede untereinander und zur Ausgangszelllinie untersucht werden.

Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Labor für Leukämiediagnostik am Klinikum der LMU Großhadern durchgeführt. Versuchsleiterin war dabei Frau Dr. Stephanie Schneider.

Für die Hybridisierung der Chromosomen 8,17, X und Y wurden Chromosome Enumeration Probe (CEP) Sonden genutzt. Diese DNA-Sonden binden jeweils an Chromosomen-spezifische alpha-Satelliten und ermöglichen somit eine schnelle Quantifizierung. Für Chromosom 21 wurde eine Locus Specific Identifier (LSI) Sonde genutzt. Hierbei wird das Zielchromosom durch Bindung der Sonde an einen Chromosomen-spezifischen DNA-Locus sichtbar gemacht. Beide der genannten Sonden zeichnen sich dadurch aus, dass sie an Interphase-Chromosomen binden können. Das Vorliegen von Metaphase-Chromosomen war somit nicht erforderlich. Tabelle 3-6 zeigt eine detaillierte Übersicht der genutzten Sonden.

Die zu hybridisierenden Zellpopulationen wurden jeweils auf einem Objektträger mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend luftgetrocknet. Auf zuvor markierte Hybridisierungsstellen wurde anschließend 1,5µl der jeweiligen Sonde pipettiert. Nach Aufbringung und Abdichtung von Deckgläsern auf die Objektträger begann der Hybridisierungsprozess im Thermobrite. In diesem automatisierten System wurden die fertigen Proben zunächst für 3 Minuten bei 73°C denaturiert und anschließend für 12 Stunden bei 37°C hybridisiert.

Anschließend erfolgte, nach Entfernung der Deckgläser, eine Waschung der Objektträger mit 0,4x Sialin-Natrium-Zitrat Puffer (SSC) und 0,1-prozentigem Octoxinol 9. Zusätzlich wurde auf jedes Präparat ein Tropfen gelöstes 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegeben. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet an Adenin/Thymin-reiche Regionen der DNA und ermöglicht somit zusätzlich die Darstellung des gesamten Zellkerns in der Fluoreszenzmikroskopie. Abschließend wurden die Präparate mittels Zugabe von DAPI-Antifade-Lösung haltbar gemacht und mit einem Deckglas erneut fixiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C und Dunkelheit im Kühlschrank.

Ausgewertet wurde am Fluoreszenzmikroskop. Hierbei konnten die jeweiligen fluoreszierenden Sonden zur Quantifizierung von Polyploidien ausgezählt werden.

3.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller erhobenen Daten wurde mittels der Software Graphpad Prism Version 6f durchgeführt. Da bei der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen nicht sicher von einer Gaußschen Normalverteilung ausgegangen werden kann, wurden nicht-parametrische Tests genutzt um Signifikanz zu prüfen. Für den Vergleich gepaarter Werte wurde der Wilcoxon-Test genutzt. Bei ungepaarten Werten wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden angenommen, wenn $p < 0,05$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten und Spendercharakteristika

4.1.1 Patientencharakteristika

Alle zehn untersuchten Patienten waren zum Zeitpunkt der Rekrutierung wegen eines histologisch gesicherten STS in stationärer Behandlung. Aufgrund möglicher Effekte einer chemotherapeutischen Vorbehandlung auf das Immunsystem und die Funktion von NK-Zellen wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen, die bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine chemotherapeutische Behandlung erhalten hatten (sogenannte Erstlinienpatienten). Bei sechs der Patienten wurde zuvor eine unzureichende Resektion des Tumors durchgeführt, vier waren aufgrund lokaler Inoperabilität nicht voroperiert.

Die Charakteristika der eingeschlossenen Patienten sind in der nachfolgenden Tabelle (4-1) aufgeführt.

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Histologie	Voroperation
P14-001	m	48	Fibröses Synovialsarkom	nein
P14-002	w	64	Uterussarkom	R1
P14-003	w	57	Leiomyosarkom	R2
P14-004	w	65	Liposarkom	nein
P14-005	m	52	Leiomyosarkom	nein
P14-006	m	59	Leiomyosarkom	R2
P14-007	w	52	maligner peripherer Nervenscheidentumor	nein
P14-008	m	27	undifferenziertes pleomorphes Sarkom	R2
P14-009	w	27	Myxoides Liposarkom	R2
P14-010	w	44	endometriales Stromasarkom	R1
Durchschnitt (Median)		49,5 (52)		

Tabelle 4-1 Patientencharakteristika

Legende: m = männlich, w = weiblich, R1 = marginale Tumorresektion, R2 = intraläsionale Tumorresektion

4.1.2 Spendercharakteristika

Das Spenderkollektiv setzte sich aus acht gesunden Personen ohne relevante Vorerkrankungen zusammen. Das Durchschnittsalter betrug 28 Jahre.

Spender	Geschlecht	Alter (Jahre)
S-14-001	w	48
S-14-002	m	25
S-14-003	w	28
S-14-004	w	25
S-14-005	m	24
S-14-006	m	25
S-14-007	w	24
S-14-008	m	26
Durchschnitt (Median)		28 (25)

Tabelle 4-2 Spendercharakteristika
Legende: m = männlich, w = weiblich

4.2 Zytotoxizität durch NK-Zellen gegen K562-Zellen von Spendern und Patienten

Patienten-NK-Zellen zeigten im Vergleich zu Spender-NK-Zellen eine deutlich schwächere Zytotoxizität gegen die erythroleukämischen Zelllinie K562, welche aufgrund fehlender MHC I-Expression ein Standard NK-Zell Target darstellt. Insgesamt wurden ⁵¹Chrom-Freisetzungssassays von acht Spendern und acht Patienten durchgeführt. Die durchschnittlich erreichte Lyse betrug 74,3% der maximal möglichen Lyse in der Spendergruppe gegenüber 42,1% in der Patientengruppe bei einer E/T ratio von 50:1. Die Unterschiede waren bei einem p-Wert von 0,015 statistisch signifikant. Die von Bücklein et. al. beschriebene verminderte Zytotoxizität von Patienten-NK-Zellen gegen K562 konnte somit bestätigt werden.⁵²

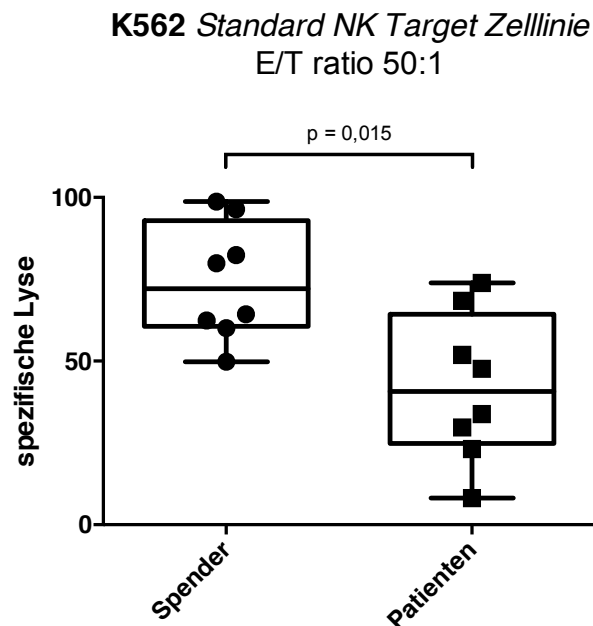


Abbildung 4-1 Vergleich der Zytotoxizität von Spender- und Patienten-NK-Zellen gegen K562
Die spezifische Toxizität von NK-Zellen gesunder Spender (n = 8) und STS-Patienten (n = 8) gegen K562 wurde mittels Standard 4h $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assay gemessen. Die Darstellung zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte bei einer E/T ratio von 50:1 im Box-Whisker-Plot. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt.

4.3 GD2-Expression verschiedener Tumorzelllinien

Mittels Durchflusszytometrie wurden verschiedene Neuroblastom-, Ewing-Sarkom- und STS-Zelllinien auf ihre Expression des GD2-Antigens untersucht.

4.3.1 Antikörper-Titration

Im Rahmen dieser Untersuchungen erfolgte zunächst die Titration des PE-konjugierten Anti-GD2 FACS-Antikörpers. Ziel dieser war es die ideale Menge des Antikörpers zu finden. Dabei muss beachtet werden, dass zu viel Antikörper zu unspezifischen und niedrig affinen Bindungen und damit zu verminderter Sensitivität der Messung führt. Auf der anderen Seite führt die Verwendung von zu wenig Antikörper ebenfalls zu einer verminderten Sensitivität, da nicht alle Antigene eine Bindung mit dem Antikörper eingehen.

Ausgehend von der vom Hersteller empfohlenen Menge von 5 μl pro 1×10^6 Zellen wurde eine Verdünnungsreihe für die eingesetzten Antikörpermengen erstellt. Es wurden zusätzlich die Mengen 2,5 μl , 1,25 μl und 0,63 μl pro 1×10^6 Zellen genutzt. In der durchflusszytometrischen Analyse der stark GD2-exprimierenden Neuroblastom-Zelllinie LAN-1 stellte sich dabei 5 μl (in Abbildung 4-2 blau markiert) als ideale Menge des Antikörpers heraus, da die positive Population hier das am stärksten positive Signal zeigte. Deshalb wurde besagte Menge in allen folgenden Versuchen mit Sarkom-Zelllinien verwendet.

LAN-1 Neuroblastom

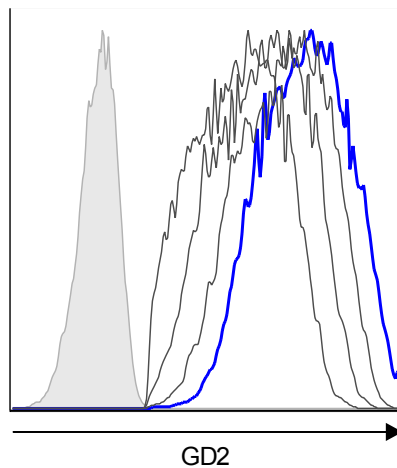


Abbildung 4-2 Titration PE Anti-GD2 Antikörper

Darstellungen im Histogramm: blaue Linie = GD2-positive Zellpopulation bei 5 µl PE-Anti-GD2 Antikörper pro 1×10^6 Zellen; graue Linien von links nach rechts = GD2-positive Zellpopulationen bei 0,63 µl, 1,25 µl, 2,5 µl PE-Anti-GD2 Antikörper pro 1×10^6 Zellen; grau hinterlegt = Isotypkontrolle

4.3.2 Neuroblastom-Zelllinien als Positivkontrolle (LAN-1 und LS)

Die beiden Neuroblastom-Zelllinien LAN-1 und LS wurden freundlicherweise von Philipp Schlegel und Peter Lang aus der Abteilung für Kinderonkologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Für beide war, auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen, eine Expression des GD2-Antigens auf allen Tumorzellen nachweisbar. Als Positivkontrollen für weitere Versuche wurden LAN-1-Zellen ausgewählt.

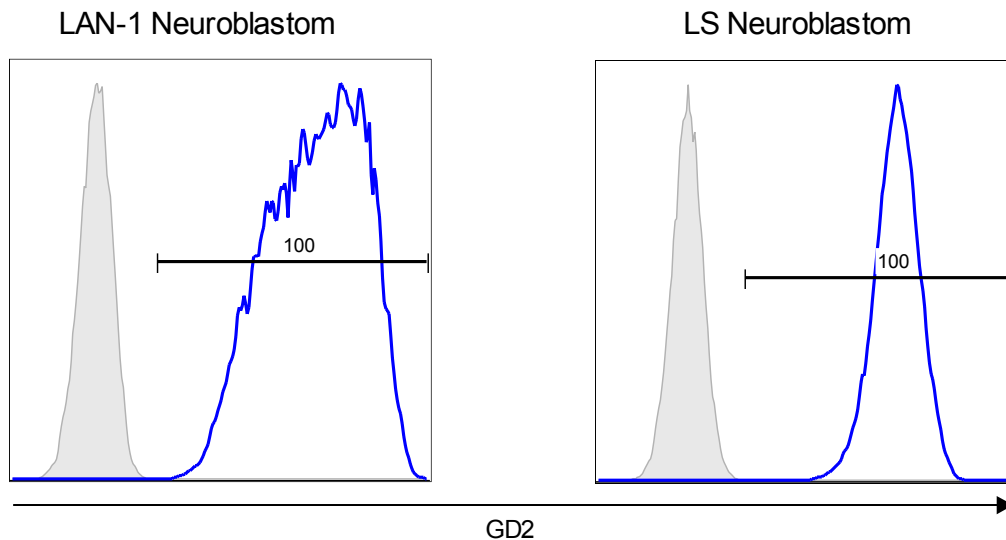


Abbildung 4-3 GD2-Expression auf Neuroblastom-Zelllinien

Die GD2-Expression der Zelllinien LAN-1 und LS wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Darstellungen im Histogramm: blaue Linien = GD2-positive Zellpopulationen; grau hinterlegt = Isotypkontrollen. Schwarze Gates zeigen den jeweiligen Anteil GD2-positiver Zellen in Prozent.

4.3.3 Liposarkom-Zelllinie (SW872)

Während die Mehrheit der Zellen von SW872 negativ für eine GD2-Expression war, zeigten etwa 40% der Zellen teils eine starke GD2-Expression. Die Zelllinie diente aufgrund dieser teilweisen GD2-Expression im Verlauf der Arbeit als Target-Zelllinie für Zytotoxizitätsmessungen.

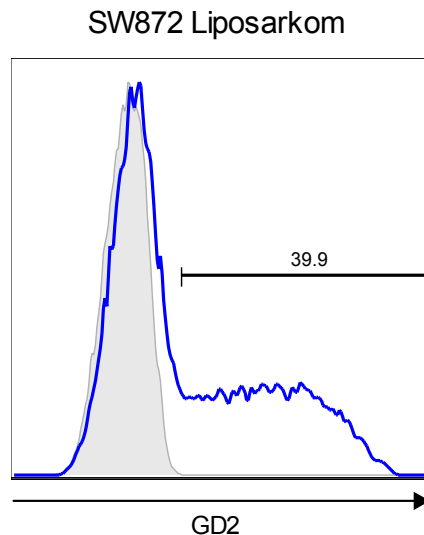


Abbildung 4-4 GD2-Expression der Liposarkom-Zelllinie SW872

Die GD2-Expression der Zelllinie SW872 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Darstellungen im Histogramm: blaue Linie = teilweise GD2-positive Zellpopulation; grau hinterlegt = Isotypkontrolle. Schwarzes Gate zeigt den Anteil GD2-positiver Zellen in Prozent.

4.3.4 Ewing-Sarkom-Zelllinien (TC-71 und RD-ES)

Die Ewing-Sarkom-Zelllinie TC-71 zeigte einen hohen Anteil an GD2-exprimierenden Zellen, während die Zelllinie RD-ES negativ für GD2 war. TC-71 wurde trotz der Tatsache, dass es sich beim Ewing-Sarkom um ein vom Knochen ausgehendes Sarkom - also keinem Weichteilsarkom im eigentlichen Sinne - handelt für die späteren Messungen der GD2-vermittelten Zytotoxizität von NK-Zellen genutzt. RD-ES wurde nicht weiter berücksichtigt.

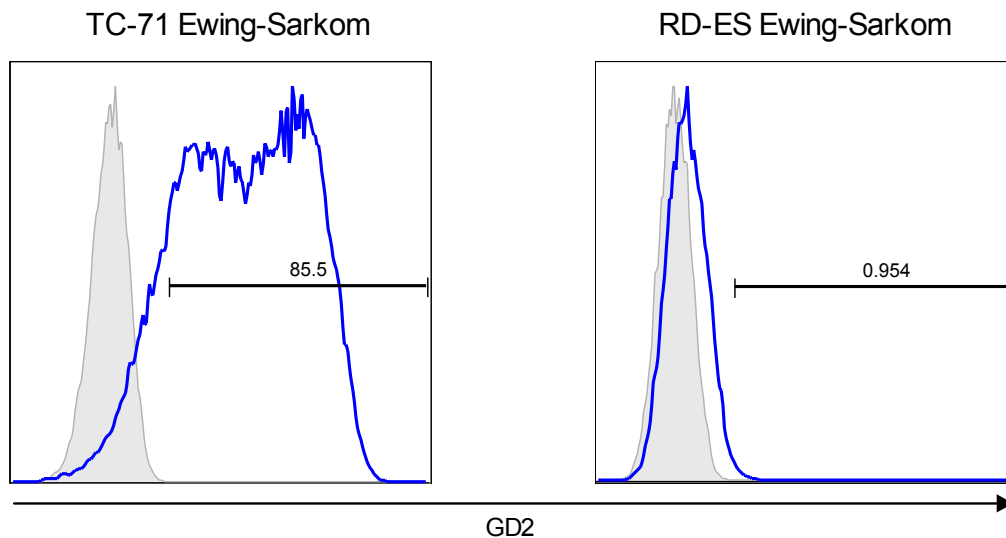


Abbildung 4-5 GD2-Expression auf Ewing-Sarkom-Zelllinien

Die GD2-Expression der Zelllinien TC-71 und RD-ES wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Darstellungen im Histogramm: blaue Linie links = GD2-positive Zellpopulation TC-71; blaue Linie rechts = GD2-negative Zellpopulation RD-ES; grau hinterlegt = Isotypkontrollen. Schwarze Gates zeigen den jeweiligen Anteil GD2-positiver Zellen in Prozent.

4.3.5 Leiomyosarkom-Zelllinie (SKUT-1)

SKUT-1 zeigte keine GD2-Expression. Sie diente dennoch als Target-Zelllinie für Zytotoxizitätsmessungen von NK-Zellen, im Sinne einer Negativkontrolle für die GD2-vermittelte Zytotoxizität.

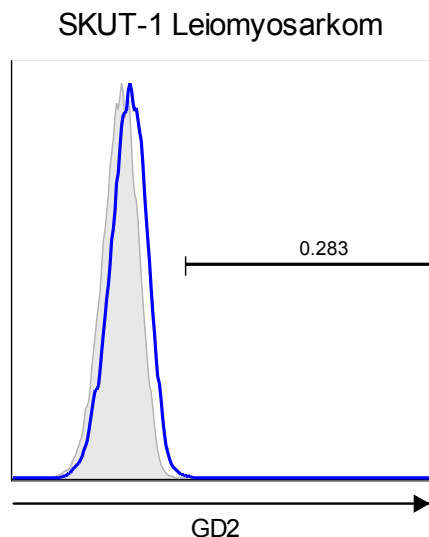


Abbildung 4-6 GD2-Expression der Leiomyosarkom-Zelllinie SKUT-1

Die GD2-Expression der Zelllinie SKUT-1 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Darstellungen im Histogramm: blaue Linien = GD2-negative Zellpopulation; grau hinterlegt = Isotypkontrolle. Schwarzes Gate zeigt den Anteil GD2-positiver Zellen in Prozent.

4.3.6 Rhabdomyosarkom-Zelllinien (RH-18 und A673)

Entgegen anderslautender Literaturangaben⁷⁵ war für die Rhabdomyosarkom-Zelllinie RH-18 keine GD2-Expression nachweisbar. Auch A673 zeigte nur eine geringe Expression, sodass im Verlauf keine weiteren Versuche mit beiden Zelllinien durchgeführt wurden.

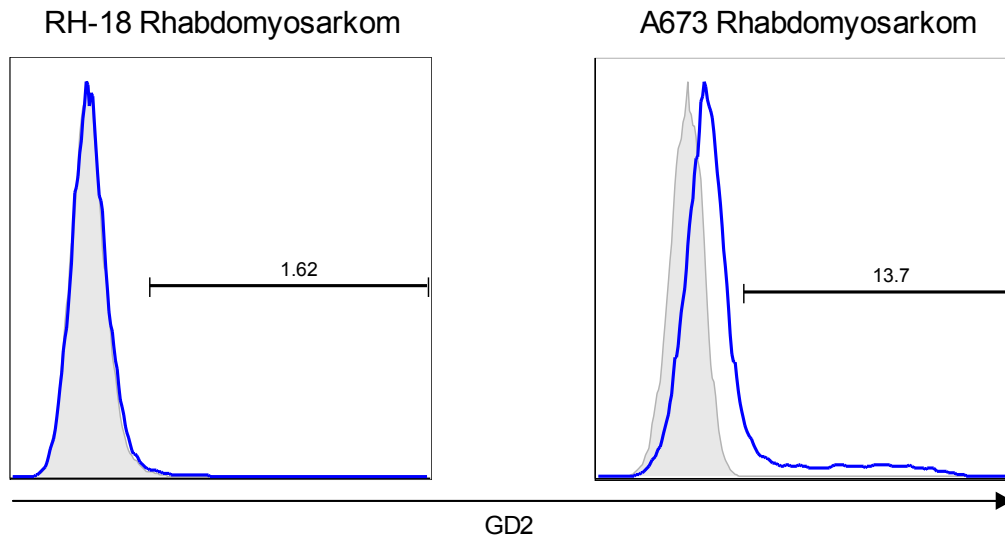


Abbildung 4-7 GD2-Expression auf Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Die GD2-Expression der Zelllinien RH-18 und A673 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Darstellungen im Histogramm: linke blaue Linie = GD2-negative Zellpopulation RH-18; rechte blaue Linie = schwach GD2-positive Zellpopulation A673; grau hinterlegt = Isotypkontrollen. Schwarze Gates zeigen den jeweiligen Anteil GD2-positiver Zellen in Prozent.

4.3.7 Synovialsarkom-Zelllinie (SW982)

SW982 zeigte keinerlei GD2-Expression und wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr berücksichtigt.

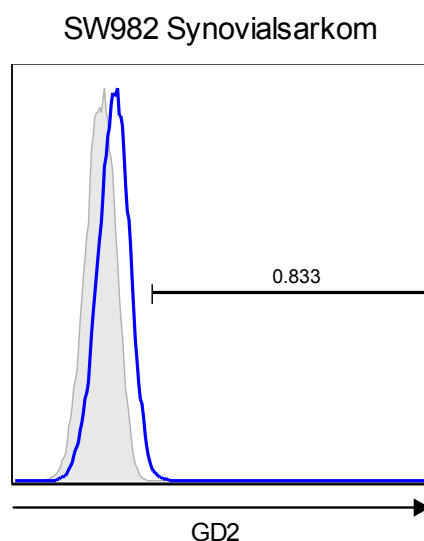


Abbildung 4-8 GD2 Expression der Synovialsarkom-Zelllinie SW982

Die GD2-Expression der Zelllinie SW982 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Darstellungen im Histogramm: blaue Linien = GD2-negative Zellpopulation; grau hinterlegt = Isotypkontrolle. Schwarzes Gate zeigt den Anteil GD2-positiver Zellen in Prozent.

4.4 GD2-vermittelte Zytotoxizität durch unstimulierte NK-Zellen bei Sarkom-Zelllinien

In den folgenden Versuchen wurde die Zytotoxizität von unstimulierten NK-Zellen gegen Sarkom-Zelllinien in Abhängigkeit von Anti-GD2-Antikörpern mittels $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assays untersucht. Der für einen Großteil der Experimente verwendete Antikörper ch14.18 wurde von Philipp Schlegel und Peter Lang aus der Abteilung für Kinderonkologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde der Antikörper ME36.1 von der Firma Trion Research GmbH bereitgestellt.

4.4.1 Titration der Anti-GD2-Antikörper-Konzentration (ch14.18)

Um die effizienteste Konzentration des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 für die Zytotoxizitätsmessungen zu ermitteln wurde eine Titration durchgeführt. Im hierfür genutzten $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assay dienten NK-Zellen eines gesunden Spenders als Effektorzellen. Als Targetzellen wurden Liposarkomzellen der Zelllinie SW872 verwendet. Die Konzentration von ch14.18 wurde stetig erhöht bis sich keine Zunahme der spezifischen Lyse mehr zeigte. Bei einer E/T ratio von 25:1 pendelte sich der Plateaubereich bei Werten um 30% ein. Als optimale Antikörperkonzentrationen ergaben sich infolgedessen $1\mu\text{g/ml}$ und $10\mu\text{g/ml}$. Diese Konzentrationen wurden bei allen folgenden Versuchen angewendet. Abbildung 4-9 zeigt die logarithmierte Konzentrations-Wirkungskurve. Diese hat einen typischen sigmoidalen Verlauf. Beim Wert von 1 auf der X-Achse ($10\mu\text{g/ml}$ ch14.18) nähert sie sich bereits asymptotisch an den möglichen Maximaleffekt an. Von der Nutzung höherer Antikörperkonzentrationen wurde deshalb abgesehen. Als mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) konnte der Wert $0.035\mu\text{g/ml}$ ermittelt werden.

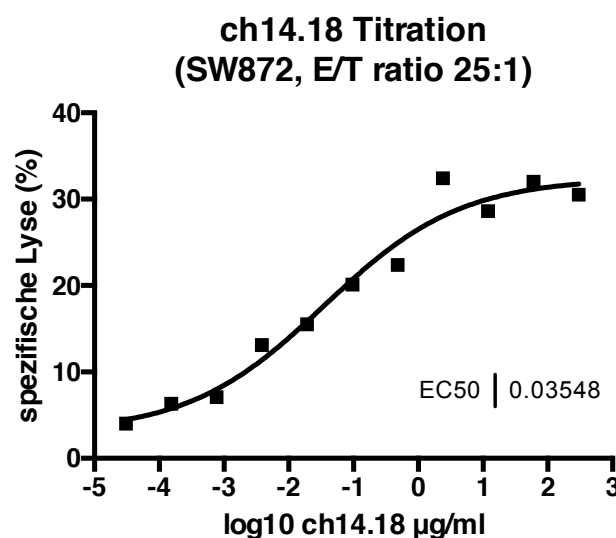


Abbildung 4-9 Titration des ch14.18 Antikörpers

Die Titration des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 erfolgte anhand eines Standard 4h $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assays. Die Abbildung zeigt die logarithmierte Konzentrations-Wirkungskurve bei einer E/T ratio von 25:1

4.4.2 Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender

Im nächsten Schritt wurde die GD2-vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen gesunder Spender gegen die Zelllinien SW872 (Liposarkom), TC-71 (Ewing-Sarkom) und SKUT-1 (Leiomyosarkom) untersucht. Ausschlaggebend für die Wahl dieser drei Zelllinien waren die in Kapitel 4.3 ermittelten, jeweils verschiedenen Level an GD2-Expression.

Mit den STS-Zelllinien SW872 (Liposarkom) und SKUT-1 (Leiomyosarkom) handelt es sich dabei um eine teilweise GD2-positive, sowie um eine GD2-negative Zelllinie. Zusätzlich wurde mit der Ewing-Sarkom-Zelllinie TC-71 ein Knochensarkom mit einem hohen Anteil an GD2-positiven Zellen untersucht.

4.4.2.1 Liposarkom-Zelllinie (SW872)

Bei der teilweise GD2-positiven Liposarkom-Zelllinie zeigte sich eine signifikante Zunahme der Tumorzell-Lyse durch NK-Zellen bei Zugabe von ch14.18. Bei allen acht Spendern kam es zu einer Erhöhung der Zytotoxizität der NK-Zellen nach Koinkubation mit dem Antikörper. So konnte mit Hilfe beider der gewählten Antikörperkonzentrationen von 1 µg/ml und 10 µg/ml bei einer E/T ratio von 50:1 durchschnittlich fast die Hälfte der maximal möglichen Tumorzell-Lyse erreicht werden, während ohne den Antikörper durchschnittlich nur 6,6% Lyse erreicht wurde. Auch in niedrigeren E/T ratios konnte ein derartiger Effekt gezeigt werden. Die durchschnittlichen Lysewerte unterschieden sich in Abhängigkeit der gewählten Antikörperkonzentration kaum. Die detaillierten Ergebnisse sind Tabelle 4-3 zu entnehmen.

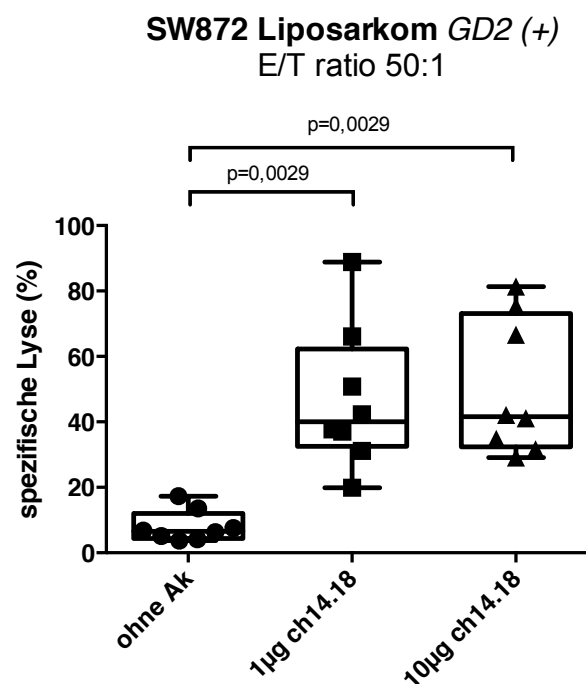


Abbildung 4-10 GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gegen SW872

Der Effekt des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 auf die Toxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender (n = 8) gegen SW872 Liposarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Die Abbildung zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (links), sowie nach Zugabe von 1 µg/ml (Mitte) und 10 µg/ml ch14.18 (rechts) bei einer E/T ratio von 50:1 im Box-Whisker-Plot. Für die statistische Analyse wurde der Wilcoxon-Test genutzt.

SW872	Ohne Ak (% Lyse)			+ 1µg/ml ch14.18 (% Lyse)			+ 10µg/ml ch14.18 (% Lyse)		
E/T ratio	Median	Mean	Range	Median	Mean	Range	Median	Mean	Range
50:1	8,0	6,6	3,7 - 17,3	40,0	46,7	19,9 – 88,9	41,6	46,7	29,1 – 81,4
25:1	2,5	3,9	0,4 – 13,8	22,2	27,5	9,4 – 61,7	23,9	28,8	13,3 – 47,9
12,5:1	0,7	1,8	0 – 7,5	11,8	15,9	2,8 – 49,8	11,5	16,0	4,9 – 39,4
6,25:1	0,5	0,9	0 – 3,1	4,5	9,9	0 – 46,1	3,5	8,4	1,0 – 36,0

Tabelle 4-3 Übersicht: GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender gegen SW872

Legende: Mean = Mittelwert, Range = Wertebereich

4.4.2.2 Ewing-Sarkom-Zelllinie (TC-71)

Auch bei der GD2-positiven Ewing-Sarkom-Zelllinie TC-71 zeigte sich eine signifikante Verstärkung der Zytotoxizität von NK-Zellen nach Zugabe von ch14.18. Für diese Zelllinie wurden NK-Zellen von insgesamt sieben Spendern untersucht. Im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien zeigte sich auch ohne Nutzung des Anti-GD2-Antikörpers eine ausgeprägte NK-Zell-vermittelte Lyse von durchschnittlich 33,3% der maximal möglichen Lyse bei einer E/T ratio von 50:1. Diese konnte bei einer Antikörperkonzentration von 1µg/ml ch14.18 auf 45,4%, sowie bei Nutzung von 10µg/ml ch14.18 auf 47,8% erhöht werden. Auch in den niedrigeren E/T ratios unterschieden sich die durchschnittlich erreichten Lysewerte in Abhängigkeit der beiden Antikörperkonzentrationen nur minimal.

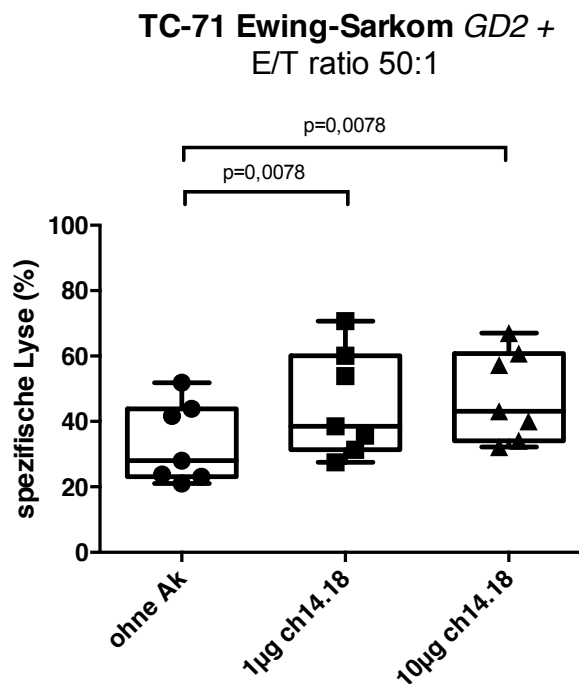


Abbildung 4-11 GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gegen TC-71

Der Effekt des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 auf die Toxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender (n = 7) gegen TC-71 Ewing-Sarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Die Abbildung zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (links), sowie nach Zugabe von 1µg/ml (Mitte) und 10µg/ml ch14.18 (rechts) bei einer E/T ratio von 50:1 im Box-Whisker-Plot. Für die statistische Analyse wurde der Wilcoxon-Test genutzt.

TC-71	Ohne Ak (% Lyse)			1µg ch14.18 (% Lyse)			10µg ch14.18 (% Lyse)		
E/T ratio	Median	Mean	Range	Median	Mean	Range	Median	Mean	Range
50:1	28,0	33,3	21,0 – 51,9	38,5	45,4	27,5 – 70,7	43,1	47,8	32,2 – 67,0
25:1	11,2	13,1	3,8 – 30,1	16,8	22,4	5,0 – 47,1	19,	23,2	8,1 – 44,6
12,5:1	4,7	4,2	0,2 – 8,2	7,1	10,2	0,2 – 25,3	6,8	10,2	1,6 – 24,1
6,25:1	1,2	1,0	0 – 2,1	1,8	3,1	0 – 7,6	3,5	4,4	0 – 13,6

Tabelle 4-4 Übersicht: GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender gegen TC-71

Legende: Mean = Mittelwert, Range = Wertebereich

4.4.2.3 Leiomyosarkom-Zelllinie (SKUT-1)

Bei der GD2-negativen Leiomyosarkomzelllinie SKUT-1 zeigte sich durch Zugabe des Antikörpers keine Verstärkung der NK-spezifischen Zytotoxizität. Für diese Zelllinie wurden NK-Zellen von sechs Spendern untersucht. Die durchschnittlichen Lysewerte in den Gruppen ohne Antikörper und unter Hinzugabe von 1µg/ml und 10µg/ml ch14.18 unterschieden sich kaum. In allen Gruppen wurden bei einer E/T ratio von 50:1 weniger als 10% an spezifischer Lyse erreicht. Es konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

SKUT-1 Leiomyosarkom GD2 - E/T ratio 50:1

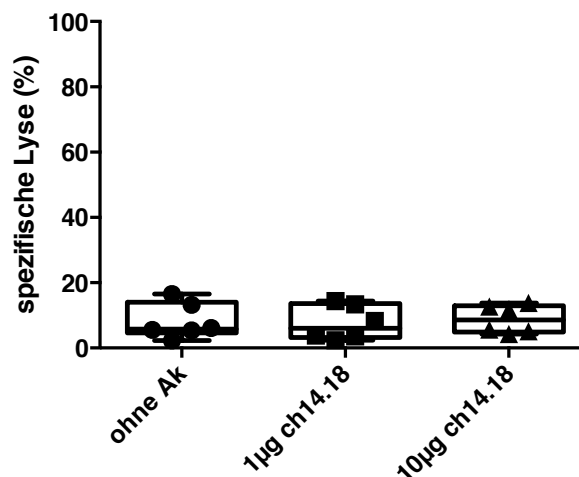


Abbildung 4-12 GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gegen SKUT-1

Der Effekt des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 auf die Toxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender (n = 6) gegen SKUT-1 Leiomyosarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Die Abbildung zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (links), sowie nach Zugabe von 1µg/ml (Mitte) und 10µg/ml ch14.18 (rechts) bei einer E/T ratio von 50:1 im Box-Whisker-Plot. Für die statistische Analyse wurde der Wilcoxon-Test genutzt.

SKUT-1	Ohne Ak (% Lyse)			1µg ch14.18 (% Lyse)			10µg ch14.18 (% Lyse)		
E/T ratio	Median	Mean	Range	Median	Mean	Range	Median	Mean	Range
50:1	5,8	8,2	2,3 – 16,5	6,1	7,6	2,4 – 14,4	8,6	8,9	4,3 – 13,8
25:1	4,6	5,4	0 – 11,7	2,9	4,8	0 – 12,2	5,0	5,3	0 – 10,1
12,5:1	3,2	3,1	0 – 7,4	2,6	3,1	0 – 9,0	2,0	2,7	0 – 6,7
6,25:1	0,2	0,9	0 – 3,2	0,6	1,1	0 – 4,3	0,4	1,0	0 – 3,3

Tabelle 4-5 Übersicht: GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender gegen SKUT-1

Legende: Mean = Mittelwert, Range = Wertebereich

4.4.2.4 Vergleich der GD2-vermittelten NK-Zytotoxizität für Anti-GD2-Antikörper (ch14.18 vs ME36.1)

Zum Vergleich der Zytotoxizität der Anti-GD2 Antikörper ch14.18 und ME36.1 wurden NK-Zellen eines gesunden Spenders genutzt. Als Konzentration von ME36.1 wurde, entsprechend der Herstellerangaben, 10µg/ml genutzt. Es zeigte sich eine stärkere GD2-vermittelte Tumorzell-Lyse durch die Nutzung beider Konzentrationen von ch14.18, verglichen mit ME36.1 bei den Zelllinien SW872 und TC-71. Bei letzterer war die durch ME36.1-vermittelte Lyse kaum stärker als die NK-Zell-vermittelte Lyse ohne Antikörper. Bei der GD2-negativen Zelllinie SKUT-1 zeigte sich durch keinen der beiden Antikörper ein verstärkter Lyseeffekt.

Vergleich ch14.18 vs ME36.1
E/T ratio 50:1

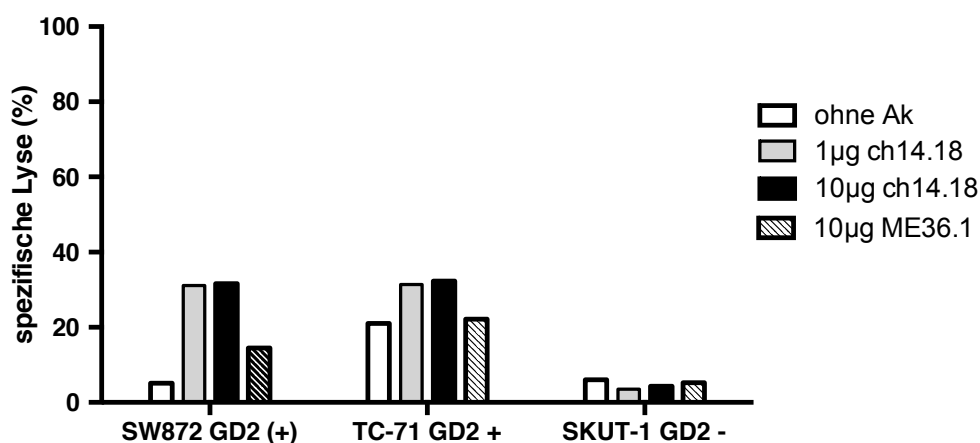


Abbildung 4-13 Vergleich der Zytotoxizität von ch14.18 und ME36.1

Die GD2-vermittelte Toxizität der beiden Antikörper wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die spezifischen Lysewerte von NK-Zellen eines gesunden Spenders gegen die drei Zelllinien SW872, TC-71 und SKUT-1 bei einer E/T ratio von 50:1. Diese sind jeweils ohne Antikörper (weiß), nach Zugabe von 1µg/ml ch14.18 (grau), 10µg/ml ch14.18 (schwarz) und 10µg/ml ME36.1 (schraffiert) bestimmt worden.

4.4.3 Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen von Sarkompatienten

In den folgenden Versuchen wurden unstimulierte NK-Zellen der Sarkompatienten aus Tabelle 4-1 auf ihre GD2-vermittelte Zytotoxizität untersucht.

4.4.3.1 Liposarkom-Zelllinie (SW872)

NK-Zellen von fünf Sarkompatienten zeigten analog zu den Zellen gesunder Spender ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität durch Hinzunahme des Anti-GD2-Antikörpers ch14.18. Beide Konzentrationen des Antikörpers bewirkten bei einer E/T ratio von 50:1 spezifische Lysewerte von über 30% der maximal möglichen Lyse, während ohne Antikörper ein durchschnittlicher Wert von nur 8,6% erreicht wurde. Wiederum gab es nur geringfügige Unterschiede bei der durchschnittlichen Lyse in Abhängigkeit der gewählten Antikörperkonzentration.

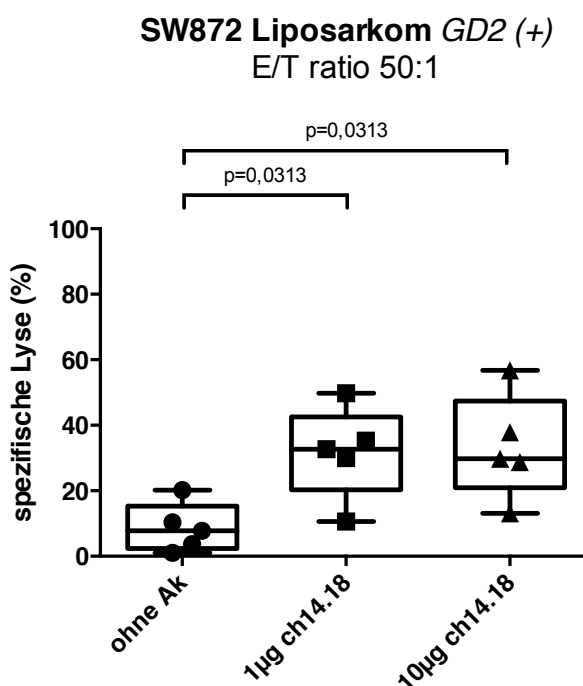


Abbildung 4-14 GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen von STS-Patienten gegen SW872
Der Effekt des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 auf die Toxizität unstimulierter NK-Zellen von STS-Patienten (n = 5) gegen SW872 Liposarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Die Abbildung zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (links), sowie nach Zugabe von 1µg/ml (Mitte) und 10µg/ml ch14.18 (rechts) bei einer E/T ratio von 50:1 im Box-Whisker-Plot. Für die statistische Analyse wurde der Wilcoxon-Test genutzt.

SW872	Ohne Ak (% Lyse)			1µg ch14.18 (% Lyse)			10µg ch14.18 (% Lyse)		
E/T ratio	Median	Mean	Range	Median	Mean	Range	Median	Mean	Range
50:1	7,8	8,6	1,0 – 20,2	32,7	31,7	10,6 – 49,8	29,8	33,3	13,1 – 56,8
25:1	2,9	4,9	1,1 – 13,8	14,4	19,3	3,7 – 44,8	16,9	19,7	4,2 – 44,5
12,5:1	2,0	3,0	0 – 8,1	6,2	11,5	2,1 – 34,0	5,1	11,1	0,8 – 35,7
6,25:1	0	2,1	0 – 6,8	4,0	6,7	0 – 24,3	1,7	6,5	0 – 25,9

Tabelle 4-6 Übersicht: GD2 vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen von Sarkompatienten gegen SW872

Legende: Mean = Mittelwert, Range = Wertebereich

4.4.4 Vergleich der Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen von Patienten und Spendern

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen⁵² und in der Einleitung bereits erwähnten Dysfunktion von NK-Zellen von Krebs- beziehungsweise STS-Patienten, wurde die GD2-vermittelte Zytotoxizität der NK-Zellen von Spendern und Patienten verglichen.

4.4.4.1 Liposarkom-Zelllinie (SW872)

Sowohl Spender-NK-Zellen als auch Patienten-NK-Zellen zeigten eine verstärkte Zytotoxizität gegen Liposarkomzellen der Zelllinie SW872 durch Zugabe des ch14.18 Anti-GD2 Antikörpers, wie in den vorigen Ergebnissen unter 4.4.2.1 und 4.4.3.1 bereits beschrieben. Patienten-NK-Zellen zeigten tendenziell eine geringere Zunahme der Zytotoxizität durch den Antikörper. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Abbildung 4-15 zeigt die relative Zunahme der Zytotoxizität von Spender- und Patienten-NK-Zellen bei Koinkubation mit 1µg/ml und 10µg/ml ch14.18. Während es bei NK-Zellen von gesunden Spendern durchschnittlich zu einer 5,7-fachen Zunahme der Zytotoxizität durch 1µg/ml ch14.18 kam (6,2-fach bei 10µg/ml), zeigten die NK-Zellen von Patienten nur eine 3,7-fache Zunahme (3,9-fach bei 10µg/ml).

Die Zytotoxizität von Spender- und Patienten-NK-Zellen gegen SW872 in Abwesenheit des Antikörpers war vergleichbar gering (Vgl. Tabelle 4-3 und 4-6).

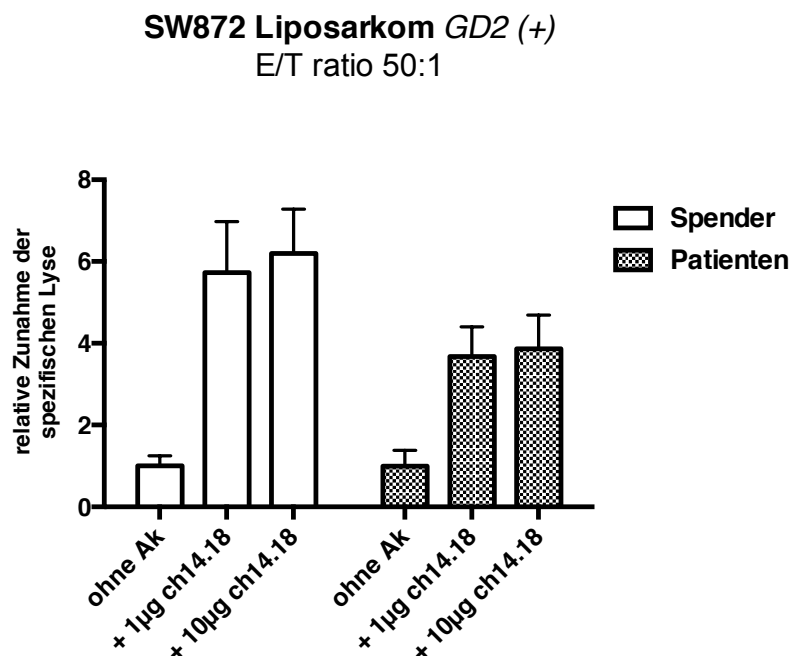


Abbildung 4-15 Vergleich der GD2-vermittelten Zytotoxizität von Patienten und gesunden Spendern
Die Darstellung zeigt die relativen Zunahmen der spezifischen Lyse von SW872 Liposarkomzellen durch NK-Zellen gesunder Spendern (n=8, weiß) und Patienten (n=5, grau) nach Zugabe von 1µg/ml ch14.18 und 10µg/ml ch14.18.

4.5 Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gesunder Spender

Die, in Kooperation mit Zellwerk GmbH, durchgeführte Langzeitkultur (Vgl. Kapitel 3.2.3.2) resultierte in einer selektiven Expansion sehr großer Mengen von NK-Zellen. Abbildung 4-16 zeigt in Zeile A die durchflusszytometrische Analyse der Vollblutprobe eines Spenders vor der Expansion, sowie in Zeile B die Zellsuspension mit einem hohen Anteil an NK-Zellen nach der Expansion. Die Proben wurden dabei zunächst auf stark CD45-positive Zellen mit geringer SSC-Streuung gated (Lymphozytengate). Da in dieser Zellpopulation sowohl T- als auch NK-Zellen enthalten sind, wurden im nächsten Schritt CD3-positive Zellen ausgeschlossen. Das CD3-Antigen ist spezifisch für T-Zellen. In der letzten Spalte sind somit fast ausschließlich NK-Zellen im Scattergramm zu sehen. Diese sind in der Abbildung anhand ihrer Expression von CD16 und CD56 in Subpopulationen aufgeteilt. Besonders auffällig ist hier der immense Mengenunterschied vor und nach der Expansion.

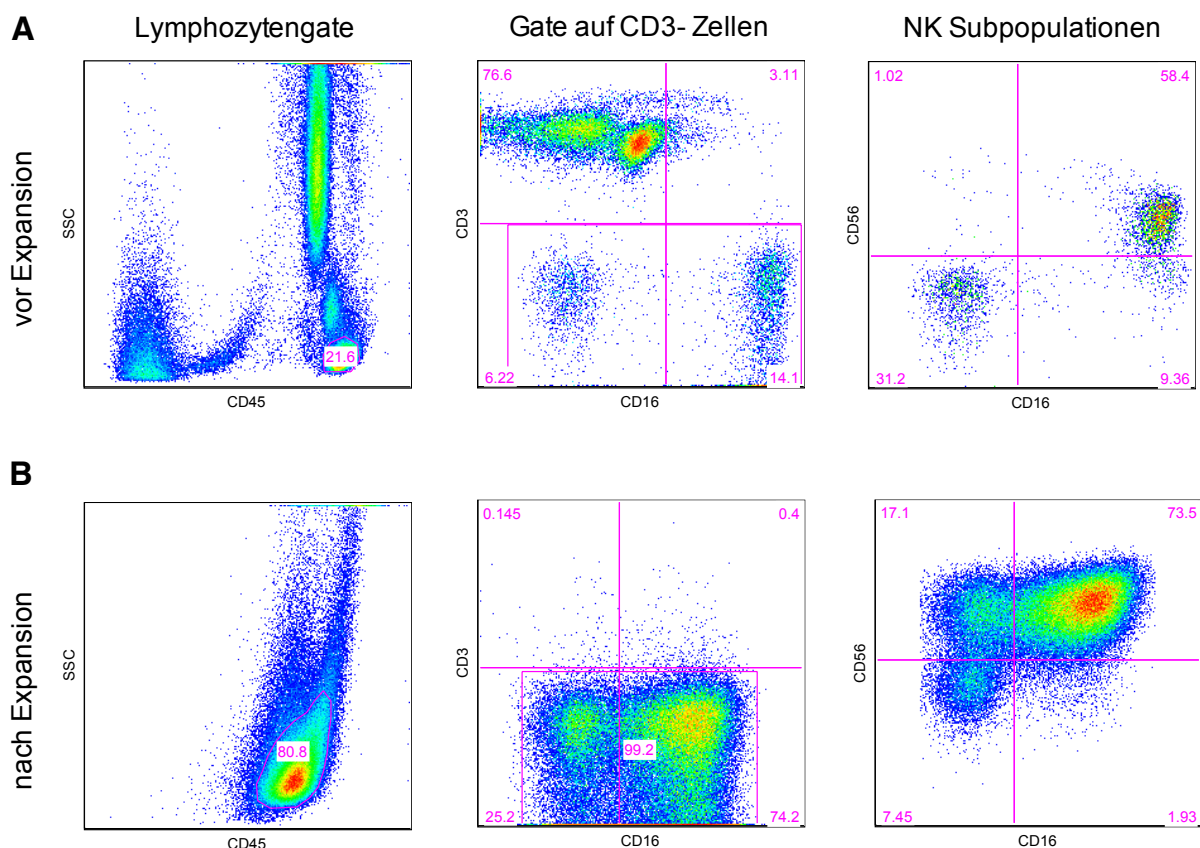


Abbildung 4-16 Vergleich von NK-Zell Populationen vor und nach Expansion

Mittels Durchflusszytometrie wurden die NK-Zell Populationen vor (A) und nach der Expansion (B) charakterisiert. Die abgebildeten Dot-Plots zeigen die dabei genutzte Gatingstrategie. Links wurden Gates (rosa) gesetzt welche Lymphozyten einschließen. In der Mitte enthalten die rosa Boxen CD3-negative NK-Zellen. Rechts sind diese anhand ihrer Expression von CD16 und CD56 aufgezeigt.

Vor und nach Expansion wurden die NK-Zellen der insgesamt drei Spender auf Expression der Oberflächenmarker CD16, NKG2D und NKp30 untersucht. Infolge der Expansion konnte in der durchflusszytometrischen Analyse eine Hochregulation der aktivierenden Rezeptoren

NKG2D und NKp30 beobachtet werden. Weiter zeigten die expandierten NK-Zellen eine verminderte CD16-Expression.

Oberflächenmarker-Expression von NK-Zellen vor und nach Expansion

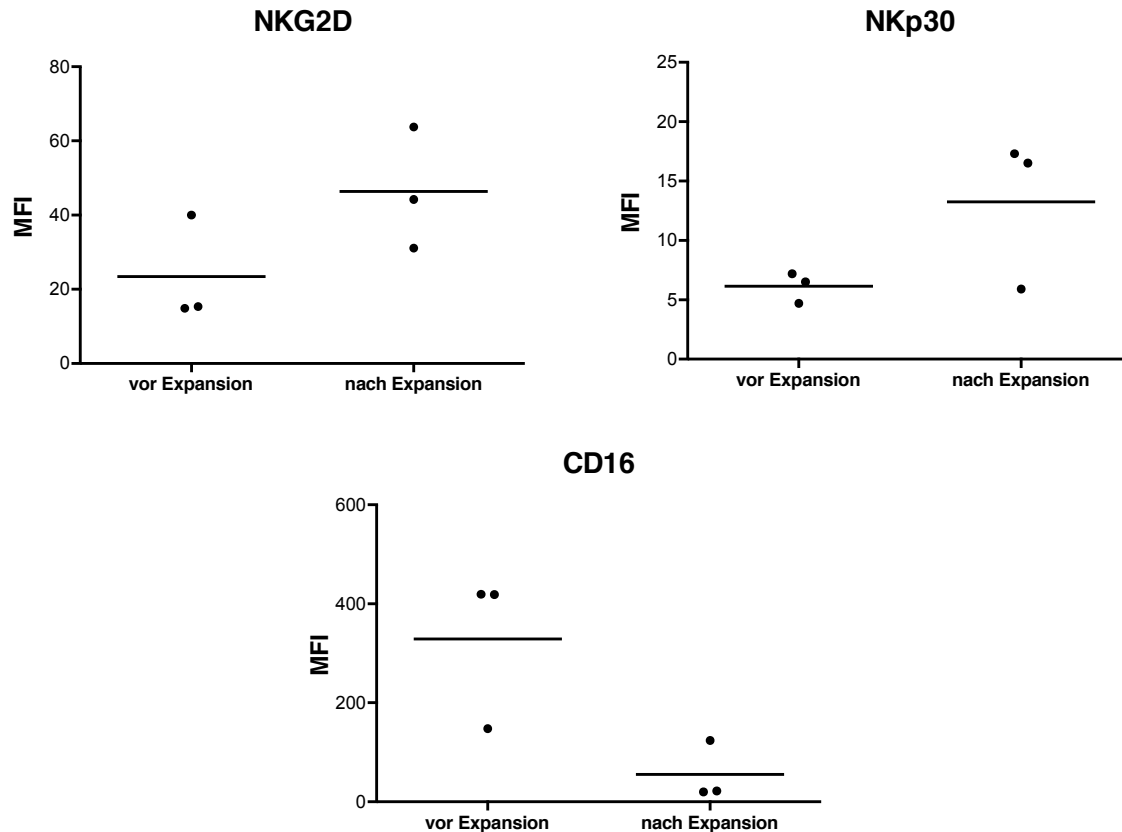


Abbildung 4-17 Oberflächenmarker-Expression von NK-Zellen vor und nach Expansion
Mittels Durchflusszytometrie wurden die Oberflächenmarker NKG2D, NKp30 und CD16 auf NK-Zellen gesunder Spender (n=3) untersucht. Die Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Marker vor und nach der Expansion.

Im Anschluss an die Charakterisierung der expandierten NK-Zellen wurden wiederum Zytotoxizitätsmessungen gegen die STS-Zelllinien SW872, TC-71 und SKUT-1 durchgeführt. Dabei wurden die erzielten Zytotoxizitäts-Werte für die expandierten NK-Zellen der drei Spender mit denen von unstimulierten NK-Zellen der selben Spender verglichen.

4.5.1 Liposarkom-Zelllinie (SW872)

Verglichen mit unstimulierten NK-Zellen zeigten expandierte NK-Zellen eine stark erhöhte Zytotoxizität gegen Liposarkomzellen der Zelllinie SW872. Auch bei niedrigen E/T ratios, in denen unstimulierte NK-Zellen fast keine Tumorzell-Lyse mehr zeigten, wurde eine vergleichsweise hohe Zytotoxizität gemessen. So konnte mit Hilfe von expandierten NK-Zellen beispielsweise bei einer E/T ratio von 6,25:1 noch fast 40% der maximal möglichen Tumorzell-Lyse erreicht werden.

SW872 Liposarkom GD2 (+)

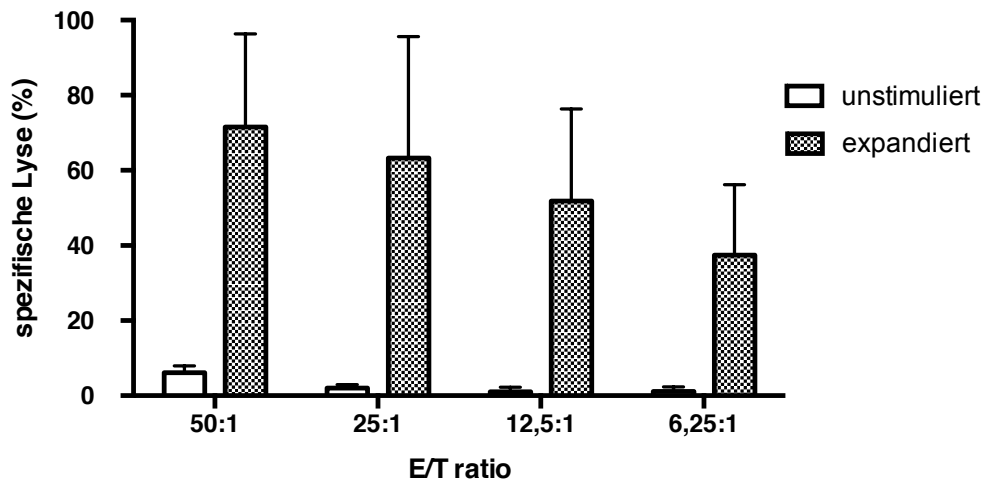


Abbildung 4-18 Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen SW872

Die Toxizität expandierter NK-Zellen gesunder Spender (n = 3) gegen SW872 Liposarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte (grau) im Vergleich mit den erreichten Lysewerten unstimulierter NK-Zellen der selben Spender (weiß) in verschiedenen E/T ratios.

4.5.2 Ewing-Sarkom-Zelllinie (TC-71)

Auch bei der Ewing-Sarkom-Zelllinie TC-71 führte die NK-Zell-Expansion zu einer stark erhöhten Tumorzell-Lyse. Diese war der Lyse durch unstimulierte NK-Zellen deutlich überlegen. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit von TC-71 für unstimulierte NK-Zellen (Vgl. 4.4.2.2), zeigte sich die relative Zunahme der Toxizität durch die Expansion in hohen E/T ratios im Vergleich mit den Zelllinien SW872 und SKUT-1 jedoch geringer ausgeprägt.

TC-71 Ewing-Sarkom GD2 +

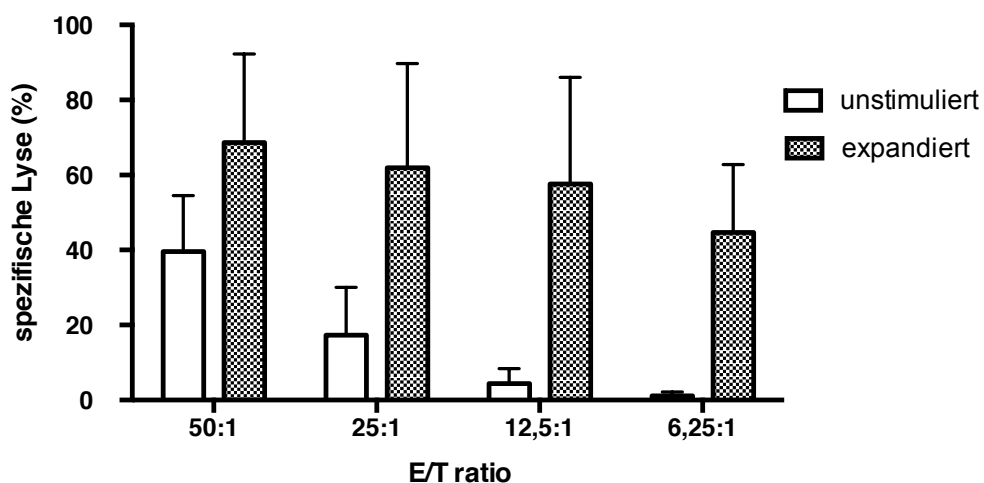


Abbildung 4-19 Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen TC-71

Die Toxizität expandierter NK-Zellen gesunder Spender (n = 3) gegen TC-71 Ewing-Sarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte (grau) im Vergleich mit den erreichten Lysewerten unstimulierter NK-Zellen der selben Spender (weiß) in verschiedenen E/T ratios.

4.5.3 Leiomyosarkom-Zelllinie (SKUT-1)

Ebenso konnte bei der Leiomyosarkom-Zelllinie SKUT-1 eine stark erhöhte Zytotoxizität durch expandierte NK-Zellen festgestellt werden, welche auch in niedrigen E/T ratios persistierte. So konnten auch hier bei einer E/T ratio von 6,25:1 noch circa 40% der maximal möglichen Tumorzell-Lyse erreicht werden.

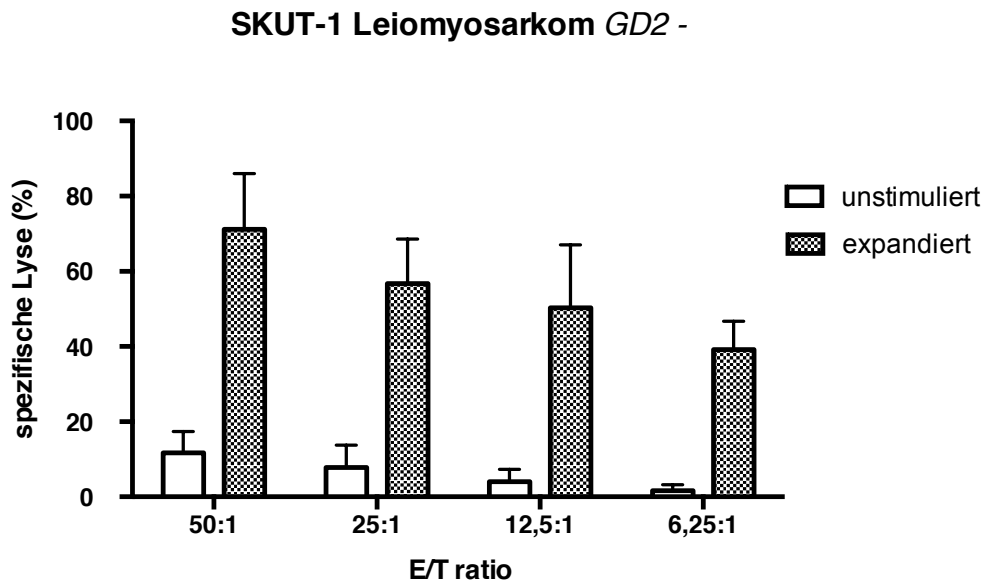


Abbildung 4-20 Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen SKUT-1

Die spezifische Toxizität expandierter NK-Zellen gesunder Spender (n = 3) gegen SKUT-1 Leiomyosarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte (grau) im Vergleich mit den erreichten Lysewerten unstimulierter NK-Zellen der selben Spender (weiß) in verschiedenen E/T ratios.

4.6 GD2-vermittelte Zytotoxizität durch expandierte NK-Zellen gesunder Spender

Anschließend wurde der Effekt des Antikörpers ch14.18 auf die Zytotoxizität von expandierten NK-Zellen gegen die STS-Zelllinien SW872 (Liposarkom), TC-71 (Ewing-Sarkom) und SKUT-1 (Leiomyosarkom) mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assays untersucht. Es wurde also gemessen ob NK-Expansion und zusätzliche Nutzung des Antikörpers synergistisch wirken. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe werden in den folgenden Unterpunkten beschrieben.

4.6.1 Liposarkom-Zelllinie (SW872)

Durch Hinzunahme des Antikörpers in den Konzentrationen 1µg/ml und 10µg/ml konnte bei der Liposarkom-Zelllinie SW872 nur eine geringe Verstärkung der Zytotoxizität der expandierten NK-Zellen in hohen E/T ratios festgestellt werden. In dieser Versuchsreihe wurden zusätzlich E/T ratios von 3,13:1, 1,56:1, 0,78:1 und 0,39:1 gemessen. Bei diesen zeigte sich durch die Nutzung des Antikörpers eine verstärkte Zytotoxizität. So konnten beispielsweise bei einer E/T ratio von 3,13:1 mit 10µg/ml ch14.18 noch über 27% der maximal möglichen Lyse erreicht werden, im Vergleich zu 16% ohne den Antikörper.

SW872 Liposarkom GD2 (+)

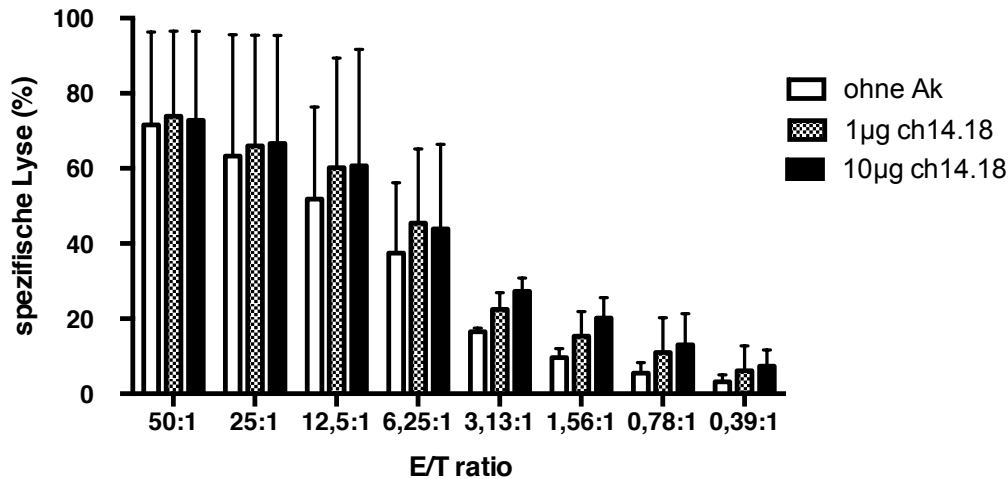


Abbildung 4-21 GD2-vermittelte Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen SW872

Der Effekt des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 auf die Toxizität expandierter NK-Zellen gesunder Spenders (n = 3) gegen SW872 Liposarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (weiß), sowie nach Zugabe von 1µg/ml (grau) und 10µg/ml ch14.18 (schwarz) bei verschiedenen E/T ratios.

4.6.1.1 Vergleich frischer und kryokonservierter NK-Zellen

Zusätzlich wurde die Zytotoxizität der expandierten NK-Zellen eines einzelnen Spenders nach Lagerung im Stickstofftank bei -180°C für 7 und 28 Tage erneut gemessen. Verglichen mit frischen NK-Zellen zeigte sich bei den zuvor kryokonservierten NK-Zellen eine mit zunehmender Konservierungsdauer abnehmende Zytotoxizität gegen SW872. Auch bei der GD2-vermittelten Zytotoxizität konnte dieser Effekt beobachtet werden.

Bei Betrachtung der Lysewerte von kryokonservierten NK-Zellen im Einzelnen fällt jedoch auf, dass - anders als bei den frischen NK-Zellen - die zusätzliche Nutzung von ch14.18 zu einer Erhöhung der Zytotoxizität führte.

SW872 Liposarkom GD2 (+)
E/T ratio 50:1

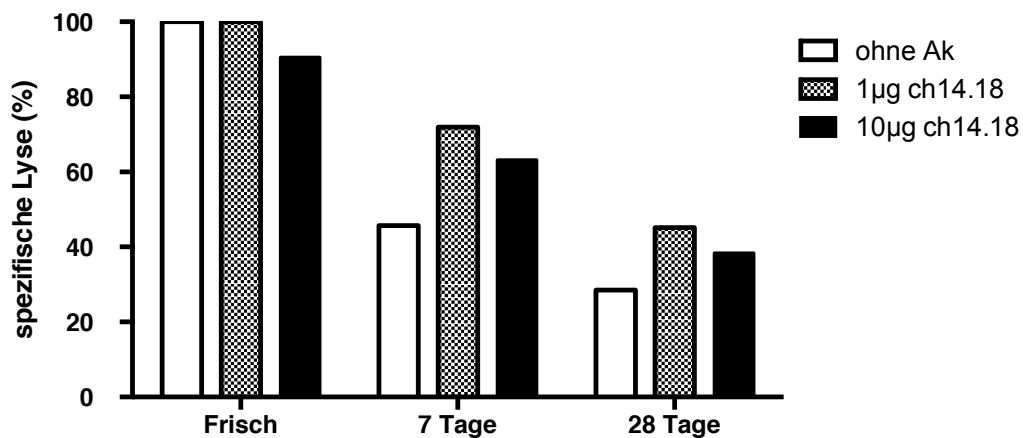


Abbildung 4-22 Vergleich frischer und kryokonservierter NK-Zellen

Unterschiede in der Zytotoxizität von frischen sowie 7 und 28 Tage kryokonservierten NK-Zellen eines einzelnen gesunden Spenders gegen SW872 Liposarkomzellen wurden mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (weiß), sowie nach Zugabe von 1µg/ml (grau) und 10µg/ml ch14.18 (schwarz) bei einer E/T ratio von 50:1.

4.6.1.2 Interleukin-Restimulation kryokonservierter NK-Zellen

In einem weiteren Ansatz sollte eine mögliche Restimulierbarkeit von zuvor kryokonservierten expandierten NK-Zellen überprüft werden. Dazu wurden diese nach dem Auftauen für 24 Stunden in Kultur genommen. Es wurden drei separate Kulturansätze erstellt. Der erste Ansatz blieb unbehandelt (d.h. Inkubation der Zellen in Zytokin-freiem Medium), während der zweite Ansatz bei einer Konzentration von 1×10^6 /ml NK-Zellen mit 500IE Interleukin 15 stimuliert wurde. Für dieselbe Konzentration an NK-Zellen, wurden im dritten Ansatz 500IE Interleukin 2 zur Stimulation genutzt. Nach Ablauf der 24 Stunden Inkubationszeit wurden die NK-Zellen für Zytotoxizitätsassays gegen die Liposarkom-Zelllinie SW872 genutzt. Hierbei zeigten die NK-Zellen aus beiden stimulierten Ansätzen höhere Lysewerte als jene aus dem unbehandelten Ansatz. Eine zusätzliche, deutliche Verstärkung der Lyse durch Nutzung des ch14.18 Antikörper konnte wiederum bei keinem der Ansätze beobachtet werden.

SW872 Liposarkom GD2 (+)
E/T ratio 50:1

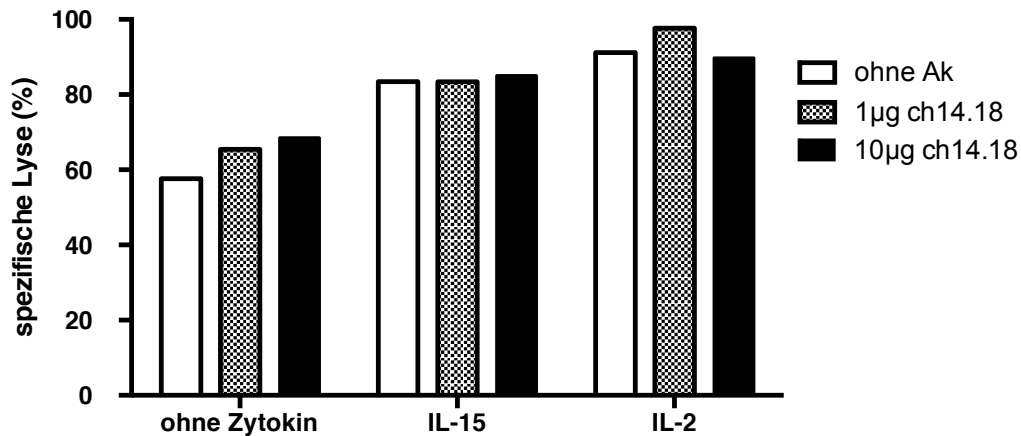


Abbildung 4-23 Zytotoxizität expandierter NK-Zellen nach IL-basierter Restimulation

Die Zytotoxizität von restimulierten NK-Zellen eines einzelnen gesunden Spenders gegen SW872 Liposarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (weiß), sowie nach Zugabe von 1µg/ml (grau) und 10µg/ml ch14.18 (schwarz) bei einer E/T ratio von 50:1. Zur Restimulation wurden die Zytokine IL-15 (Mitte) und IL-2 (rechts) genutzt. Zusätzlich wurde ein zytokinfreier Kontrollansatz erstellt (links).

4.6.2 Ewing-Sarkom-Zelllinie (TC-71)

Bei der Ewing-Sarkom-Zelllinie TC-71 konnte analog zu SW872 keine deutliche Zunahme der Zytotoxizität von expandierten NK-Zellen durch Hinzunahme des Antikörpers ch14.18 in den Konzentrationen 1µg/ml und 10µg/ml festgestellt werden. Auch hier zeigte sich bei niedrigen E/T ratios noch eine beachtliche Zytotoxizität sowohl mit als auch ohne Antikörper.

TC-71 Ewing-Sarkom GD2 +

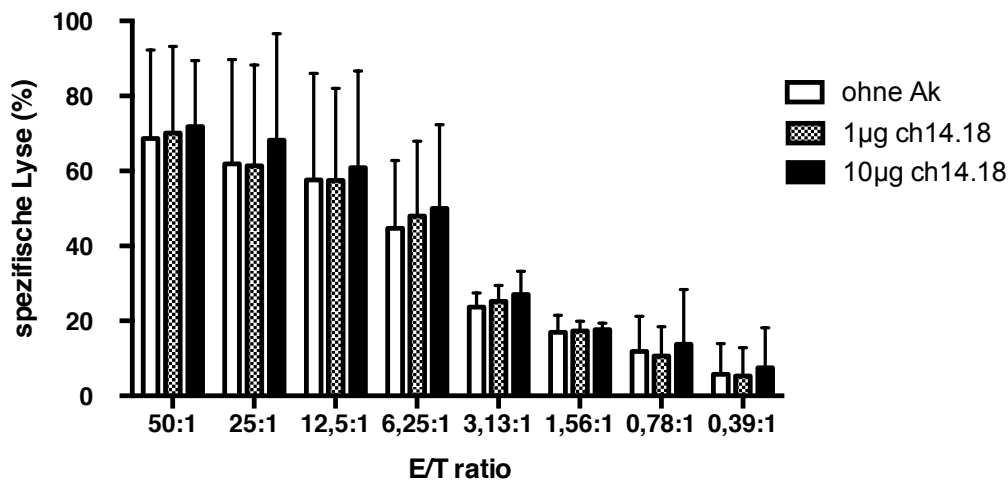


Abbildung 4-24 GD2-vermittelte Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen TC-71

Der Effekt des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 auf die Toxizität expandierter NK-Zellen gesunder Spender (n = 3) gegen TC-71 Ewing-Sarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (weiß), sowie nach Zugabe von 1µg/ml (grau) und 10µg/ml ch14.18 (schwarz) bei verschiedenen E/T ratios.

4.6.3 Leiomyosarkom-Zelllinie (SKUT-1)

Auch beim GD2-negativen Leiomyosarkom SKUT-1 führte eine Koinkubation der expandierten NK-Zellen mit den beiden Konzentrationen des Antikörpers zu keiner maßgeblichen Steigerung der Zytotoxizität. Wieder konnten beachtliche Zytotoxizitätswerte in den niedrigen E/T ratios beobachtet werden.

SKUT-1 Leiomyosarkom GD2 -

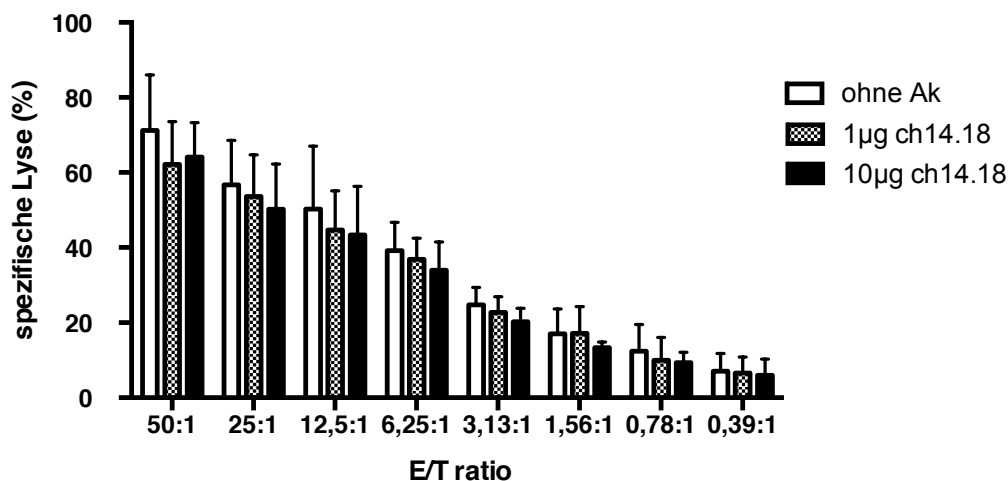


Abbildung 4-25 GD2-vermittelte Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen SKUT-1

Der Effekt des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 auf die Toxizität expandierter NK-Zellen gesunder Spender (n = 3) gegen SKUT-1 Leiomyosarkomzellen wurde mittels eines Standard 4h ⁵¹Chrom-Freisetzung-Assay gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (weiß), sowie nach Zugabe von 1µg/ml (grau) und 10µg/ml ch14.18 (schwarz) bei verschiedenen E/T ratios.

4.7 Durchflusszytometrie-basierte Sortierung der partiell GD2-positiven Liposarkomzelllinie SW872

SW872-Zellen zeigen auf einer Subpopulation eine Expression von GD2 (vgl. Kapitel 4.3.3). Es erfolgte deshalb eine Sortierung mittels FACS in eine GD2-positive und eine GD2-negative Subpopulation. In Abbildung 4-25 sind die GD2-Expressionen von Ausgangszelllinie und der beiden, durch die Sortierung entstandenen, Subpopulationen dargestellt.

Unmittelbar vor der Sortierung zeigten 44% der Zellen der Ausgangszelllinie eine unterschiedlich starke Expression von GD2. Die GD2-negative Subpopulation enthielt nach der Sortierung bei einer Reinheit von über 99% fast keine GD2-exprimierenden Zellen mehr. Bei der positiven Subpopulation zeigten 91,4% der Zellen eine überwiegend starke GD2-Expression. Zusätzlich wurde aber auch weiterhin eine geringfügige GD2-negative Population gemessen.

Beide Subpopulationen wurden im Anschluss an diese Messung in Langzeitkultur genommen und für weitere Versuche genutzt. Diese werden in den folgenden Unterpunkten beschrieben.

GD2-basierte Sortierung von Liposarkom SW872

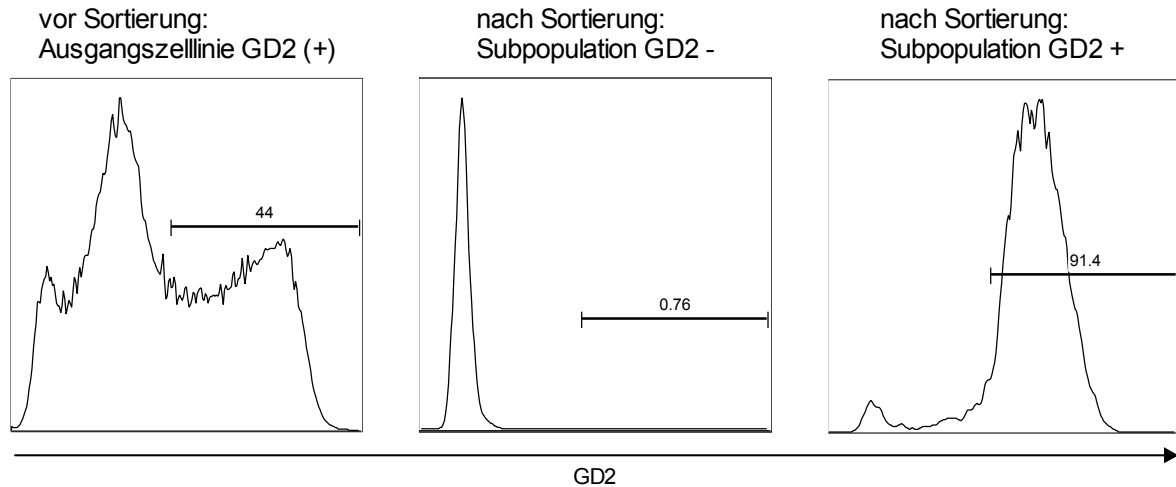


Abbildung 4-26 GD2-Expression vor und nach Sortierung der Zelllinie SW872

Die Histogramme zeigen die Populationen von SW872 vor und nach GD2-basierter Sortierung mittels FACS. Schwarze Gates kennzeichnen dabei den jeweiligen Anteil an GD2-positiven Zellen in Prozent.

4.7.1 Kinetik der GD2-Expression

Aufgrund der zuvor beschriebenen nicht vollständigen Reinheit nach der Sortierung (Vgl. Kapitel 4.7), wurde die GD2-Expression der beiden Subpopulationen in regelmäßigen Abständen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Im Rahmen dessen kam es bei der GD2-negativen Subpopulation zu einem Anstieg des prozentualen Anteils der GD2-exprimierenden Zellen. Im Verlauf erreichte dieser Werte die auf Höhe der Ausgangspopulation lagen. Die GD2-positive Subpopulation zeigte einen höheren Anteil an GD2-exprimierenden Zellen als die Ausgangspopulation, welcher auch nach 70 Tagen in Kultur bestehen blieb. Der maximale Anteil an GD2-exprimierenden Zellen während dieser Periode lag bei 95%, während die minimal gemessenen 50% an Tag 5 ebenfalls noch über dem Wert der Ausgangspopulation lagen. In besagtem Zeitraum erfolgte somit keine Regeneration des Anteils GD2-negativer Zellen auf das Ausgangsniveau (Vgl. Abb. 4-27 A).

Weiter wurde die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für beide Populationen im Verlauf bestimmt. Diese zeigte bei der negativen Subpopulation einen leichten Anstieg, insgesamt aber niedrige Werte, welche wiederum mit der denen der Ausgangspopulation vergleichbar waren. Passend zum erhöhten Anteil an GD2-exprimierenden Zellen wurden für die positive Population auch hohe Intensitäten der Fluoreszenz gemessen. Die Werte waren teilweise erheblichen Schwankungen ausgesetzt (Vgl. Abb 4-27 B).

Abschließend wurde die relative Änderung der MFI ausgehend vom jeweils gemessenen Wert an Tag 0 berechnet. Hierbei zeigte sich bei der negativen Population initial eine leicht steigende Tendenz. Bei der positiven Population wurden im Verlauf schwankende Werte ohne steigende oder fallende Tendenz ermittelt. Teils gleichläufige Tendenzen beider

Populationen deuteten dabei eher auf methodische Unterschiede hin, als auf tatsächliche MFI-Änderungen. Insgesamt bewegten die Werte beider Populationen auf einem vergleichbaren Niveau. Eine Diskrepanz in der relativen Regenerationsfähigkeit für GD2 zwischen den beiden Populationen konnte nicht nachgewiesen werden (Vgl. Abb. 4-27 C).

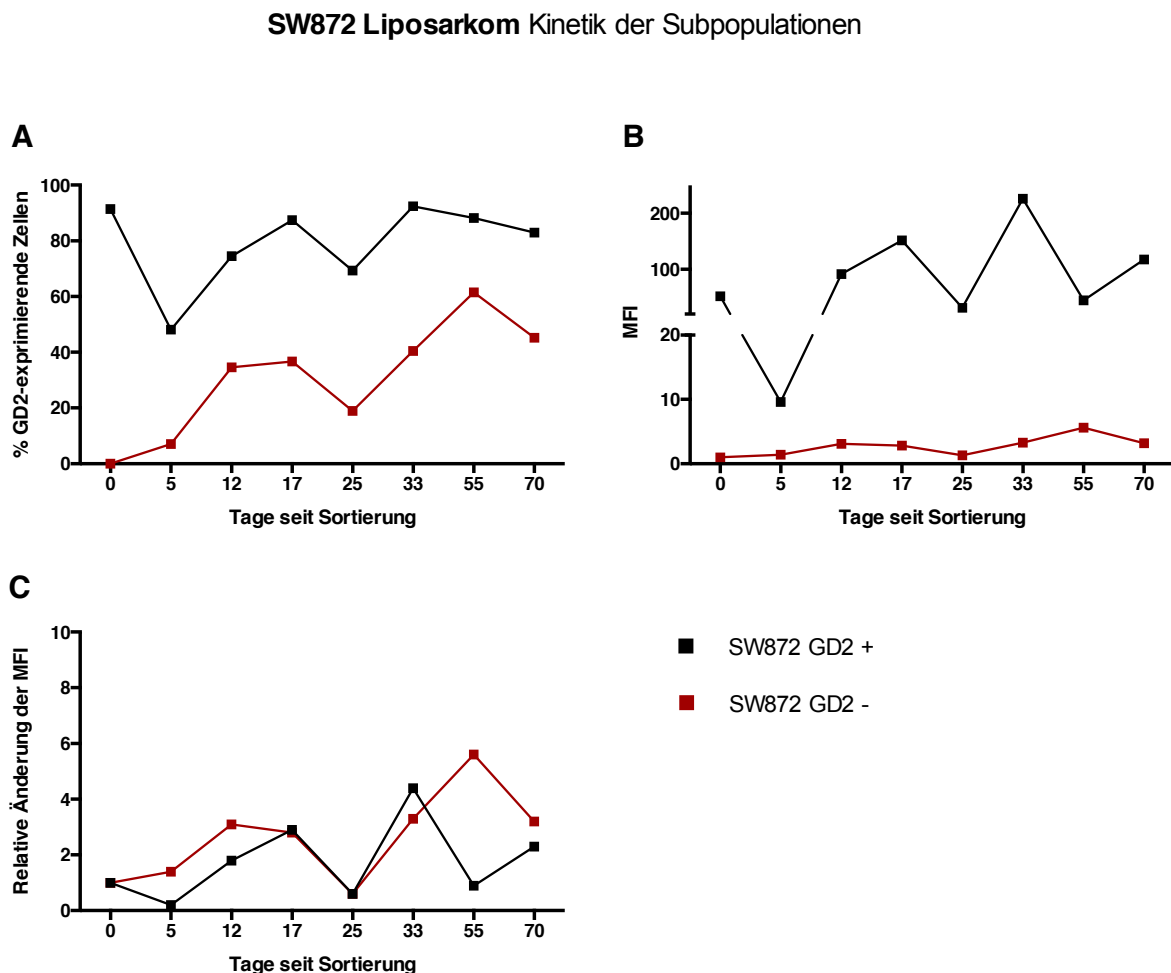


Abbildung 4-27 Kinetik der GD2-Expression der Subpopulationen von SW872

Die im Rahmen des Sortiervorgangs entstandene GD2-positive (schwarz) und GD2-negative Subpopulation (rot) der Zelllinie SW872 wurden am Tag der Sortierung sowie nach 5,17,25,33,55 und 70 Tagen mittels Durchflusszytometrie auf ihre GD2-Expression untersucht. Die Darstellungen zeigen einen Vergleich der beiden Subpopulationen im Verlauf hinsichtlich ihres Anteils von %GD2-exprimierenden Zellen (A), ihrer MFI (B), sowie der relativen Änderung der MFI (C).

4.7.2 Vergleich beider Subpopulationen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung

SW872 wird in der Referenzdatenbank der *American Type Culture Collection* (ATCC) als eine heterogene Zelllinie mit vielen chromosomalen Polyploidien charakterisiert. Unter anderem werden Polyploidien der Chromosomen 8,17 und 21 beschrieben.⁷⁶ Um potenzielle chromosomale Unterschiede der beiden Subpopulationen zu ermitteln wurden die genannten Chromosomen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung quantifiziert. Des Weiteren wurde die Anzahl (beziehungsweise das Vorhandensein) von X- und Y-Chromosomen pro Zelle

bestimmt. Mittels der Fluoreszenz in situ Hybridisierung konnten die beschriebenen Polyploidien der Referenzdatenbank bestätigt werden. Die beiden Subpopulationen stimmten, hinsichtlich des Verhältnisses von Trisomien und Tetrasomien der Chromosomen 17 und 21, weitestgehend überein. Beide Populationen zeigten einen Genotyp mit 2 X-Chromosomen und keinem Y-Chromosom. Während die Mehrzahl der Zellen der GD2-positiven Subpopulation Tetrasomien von Chromosom 8 zeigten, konnten bei der GD2-negativen Subpopulation mehr Zellen mit einer Trisomie 8 gefunden werden. Der genaue Befund kann Tabelle 4-7 entnommen werden. Weiter zeigt Abbildung 4-28 die, bei der Auswertung entstandenen, fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

		SW872 GD2 + (n Zellen)			SW872 GD2 – (n Zellen)		
Sonde	Chromosom	Disomie	Trisomie	Tetrasomie	Disomie	Trisomie	Tetrasomie
CEP#8	8	1	31	107	15	80	37
TP53/Cep#17	17	2	85	24	5	100	32
LSI 21	21	3	99	38	19	69	15
CEPX/CEP Y	X	XX: 163, 1X: 4			XX: 158, 1X:1		

Tabelle 4-7 FISH-Befund SW872 Subpopulationen

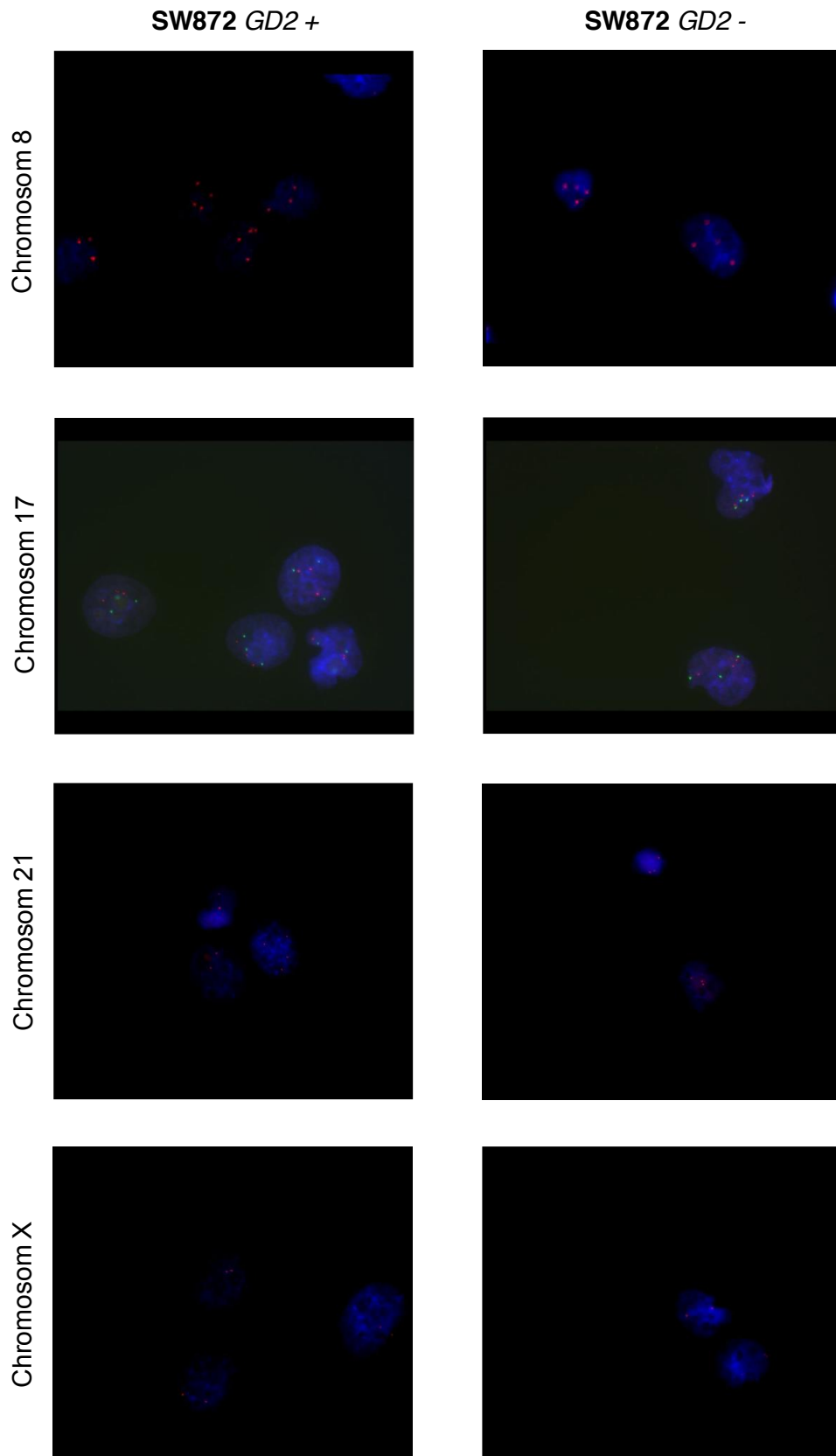


Abbildung 4-28 Fluoreszierende Gensonden auf SW872 Subpopulationen

Mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurden GD2-positive und GD2-negative Subpopulation der Liposarkom-Zelllinie hinsichtlich ihres genetischen Geschlechts sowie Polyploidien der Chromosomen 8, 17 und 21 untersucht. Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen beider Populationen mit den jeweiligen fluoreszierenden Gensonden. Die Zellkerne erscheinen aufgrund der DAPI-Färbung in einem bläulichen Licht. Gensonden auf den Chromosomen 8, 21 und X zeigen eine rote Fluoreszenz, während an Sonden auf Chromosom 17 ein rot/grüner Farbstoff gebunden ist.

4.7.3 Ergebnisse der Zelllinien-Authentifizierung

Eine Probe der in dieser Arbeit genutzten unsortierten Zelllinie SW872 wurde von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH auf Übereinstimmung mit deren Referenzzelllinie geprüft. Im Rahmen dieser Authentifizierung wurde eine Short Tandem Repeat-(STR)-Analyse durchgeführt. Insgesamt acht hochpolymorphe STR-Marker wurden bezüglich der Anzahl ihrer Wiederholungen auf beiden Allelen mittels Nonaplex-PCR und darauffolgender Fragmentlängenmessung durch Elektrophorese untersucht. Zusätzlich wurde die Probe auf Anwesenheit von DNA-Sequenzen aus Maus, Ratte und Hamster getestet.

Das ermittelte STR-Profil der eingesendeten Zelllinie SW872 zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit dem STR-Profil der parenteralen Zelllinie SW872 der internationalen Referenzdatenbank der Zellbanken ATCC (USA), DSMZ (Deutschland) und den jeweiligen Äquivalenten aus Großbritannien, Japan und Korea. Die eingesendete Probe wurde einer authentischen Zellkultur entnommen. Diese Ergebnisse sind aufgrund der Exklusionsrate des genutzten STR-Systems mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 in 114.000.000 als sicher zu betrachten. Eine Übersicht des untersuchten STR-Profils ist Tabelle 4-8 zu entnehmen.

Des Weiteren zeigte die Zelllinie ein heterozygoten, humanes DNA-Profil und war frei von Animalzellen aus Maus, Ratte, chinesischem und syrischem Hamster. Die Ergebnisse der hierfür durchgeführten PCR auf animalische Zellen werden in Tabelle 4-9 aufgeführt.

	Zelllinie	Datum	D5	D5'	D13	D13'	D7	D7'	D16	D16'	vWA	vWA'	TH01	TH01'	TPOX	TPOX'	CSF1	CSF1'	Amel	Amel'
STR-Profil der Referenz ATCC (HTB-92)	SW872	28.05.13	12	13	11	11	8	11	9	12	17	17	8	10	8	11	10	10	X	X
STR-Profil der analysierten Probe Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München AG	SW872	11.02.15	12	13	11	11	8	11	9	12	17	17	8	10	8	11	10	10	X	X

Tabelle 4-8 STR-Profil der Zelllinie SW872

Die Tabelle zeigt einen Vergleich der STR-Profile der Referenz-Zelllinie der ATCC-Datenbank und der eingesendeten Zelllinie SW872. Dabei wurden 8 STR-Marker bezüglich der Anzahl ihrer Wiederholungen auf beiden Allelen überprüft.

	Datum Animal-PCR	Maus	Ratte	Chinesischer Hamster	Syrischer Hamster
STR-Profil der Referenz ATCC (HTB-92)	28.05.13	-	-	-	-
STR-Profil der analysierten Probe Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München AG	11.02.15	-	-	-	-

Tabelle 4-9 PCR auf animalische Zellen bei der Zelllinie SW872

4.7.4 Vergleich der GD2-vermittelten Zytotoxizität beider Subpopulationen

An Tag 27 nach der Sortierung wurden Zytotoxizitätsmessungen der GD2-positiven und GD2-negativen Subpopulation sowie der Ausgangspopulation durchgeführt. Als Effektorzellen dienten dabei unstimulierte NK-Zellen eines gesunden Spenders. Zusätzlich wurde mittels Durchflusszytometrie die tagesaktuelle GD2-Expression aller Populationen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-29 zusammengefasst.

Insgesamt zeigte sich bei einer höheren GD2-Expression der Zellen auch eine höhere GD2-vermittelte Tumorzell-Lyse. So konnte bei der Ausgangszelllinie (A), bei der am Tag der Messung 40,2% der Zellen GD2-Expression zeigten, eine höhere Tumorzell-Lyse durch ch14.18 beobachtet werden als bei der GD2-negativen Subpopulation (C). Diese zeigte vergleichsweise am Tag der Zytotoxizitätsmessung nur einen Anteil von 18,9% GD2-exprimierender Zellen. Die stärkste Antikörper-vermittelte Tumorzell-Lyse zeigte sich bei der GD2-positiven Subpopulation (B), welche am Tag der Messung einen Anteil von 69,3% GD2-exprimierender Zellen zeigte. Die hier erreichten Zytotoxizitätswerte waren allerdings nur noch geringfügig höher als bei der Ausgangszelllinie (A).

Beim Vergleich beider Antikörperkonzentrationen 1µg/ml und 10µg/ml ch14.18 fiel bei keiner der Populationen ein nennenswerter Unterschied in der erreichbaren Lyse auf.

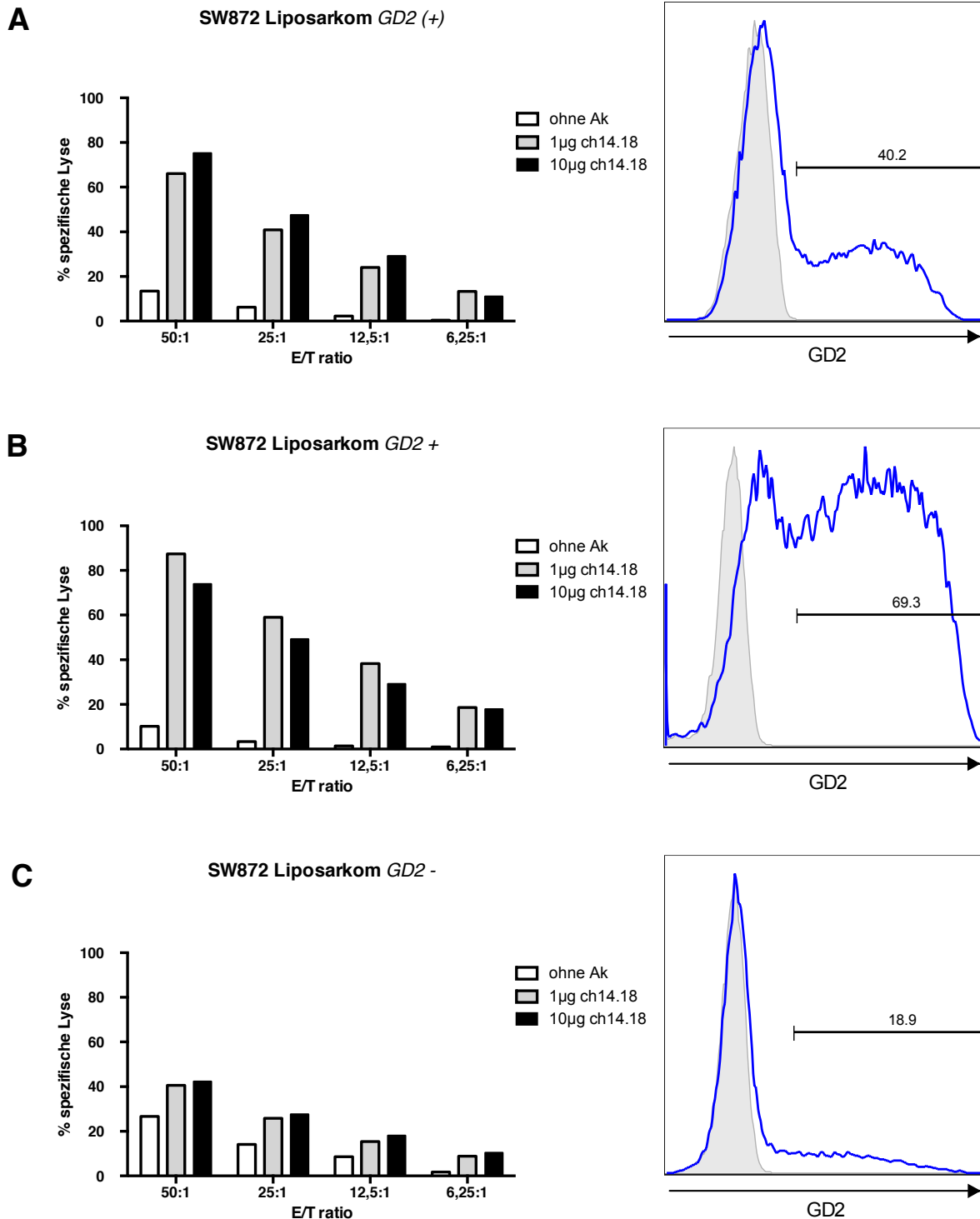


Abbildung 4-29 Zusammenhang zwischen GD2-vermittelter Zytotoxizität und GD2-Expression bei Subpopulationen von SW872

Ausgangszelllinie, GD2-positive und GD2-negative Population der Zelllinie SW872 wurden jeweils mittels Durchflusszytometrie auf ihre aktuelle GD2-Expression untersucht (rechte Spalte). Blaue Linien im Histogramm markieren dabei die unterschiedlichen Expressionslevel der Populationen. Schwarze Gates zeigen den Anteil an GD2-positiven Zellen in Prozent.

Zusätzlich wurde die GD2-vermittelte Toxizität von NK-Zellen eines einzelnen gesunden Spenders gegen die drei Populationen der Zelllinie mittels Standard 4h ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay untersucht (linke Spalte). Die Säulendiagramme zeigen die jeweiligen spezifischen Lysewerte ohne Antikörper (weiß), sowie nach Zugabe von 1µg/ml (grau) und 10µg/ml ch14.18 (schwarz) bei verschiedenen E/T ratios.

5 Diskussion

5.1 Sarkompatienten zeigen eine Dysfunktion Natürlicher Killerzellen

Die in der Literatur beschriebene Dysfunktion in Form der verminderten Zytotoxizität von NK-Zellen von STS-Patienten gegenüber der erythroleukämischen Zelllinie K562⁵² konnte in den durchgeführten Experimenten eindrücklich belegt werden (Vgl. Abb. 4.1).

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen STS-Zellen geprüft. Hierbei zeigten NK-Zellen gesunder Spender und NK-Zellen von STS-Patienten eine vergleichbar schwache Zytotoxizität gegen Liposarkomzellen der Zelllinie SW872 (Vgl. Abbildungen 4-10 und 4-14). In beiden Gruppen betrug die maximal erreichte Lyse selbst bei höchster E/T ratio von 50:1 weniger als 10%. Die gering ausgeprägte Zytotoxizität auch von NK-Zellen gesunder Spender gegen Liposarkomzellen macht deutlich, dass dieses Testsystem ungeeignet ist, Unterschiede zwischen Patienten- und Spender-NK-Zellen zu identifizieren.

Die generell geringere Lysierbarkeit von SW872-Zellen verglichen mit K562-Zellen durch NK-Zellen sowohl von Patienten als auch gesunden Spendern erklärt sich möglicherweise dadurch, dass SW872-Zellen normale Expressionslevel des KIR-Liganden MHC I aufweisen (unpublizierte Daten, persönliche Kommunikation V. Bücklein). Im Gegensatz dazu zeigen K562-Zellen ein komplettes Fehlen von MHC I auf ihrer Zelloberfläche. Aufgrund des dadurch ausbleibenden inhibitorischen Signals kommt es zu einer hohen Aktivierungsrate von NK-Zellen. Für STS-Zelllinien sowie auch für Primärmaterial ist zwar teilweise eine Verminderung der Expression von MHC I beschrieben. Ein völliges Fehlen wurde jedoch nur vereinzelt bei weit fortgeschrittener Erkrankung beobachtet.^{77,78}

Weiter exprimieren K562-Zellen mit Hitzeschockprotein (Hsp) 70 einen aktivierenden Liganden auf ihrer Zellmembran, welcher bei NK-Zellen unter anderem eine Hochregulation von NKG2D und NKp30 induzieren kann.⁷⁹ Dieser wird ebenfalls von Ewing-Sarkomen exprimiert⁸⁰, nicht aber von STS-Zelllinien. Passend dazu zeigten NK-Zellen gesunder Spender eine höhere Toxizität gegen Zellen der Ewing-Sarkom-Zelllinie TC-71 (Vgl. Abbildung 4-11) als gegen SW872-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sowohl die allgemein eingeschränkte Lysierbarkeit, als auch der hier nicht messbare Unterschied in der Zytotoxizität von NK-Zellen gesunder Spender und Patienten gegen SW872 auf der Ligandenausstattung der Targetzellen beruht. Die Dysfunktion der NK-Zellen von Patienten wird in diesem Falle also maskiert und zeigt sich eben erst bei Nutzung eines geeigneteren Targets wie K562.

Bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen sind Einschränkungen in der NK-Zell-Funktion bereits vorbeschrieben. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht immer eindeutig identifiziert. So konnte etwa beim Lungen- und Kolonkarzinom eine verstärkte Ausschüttung

von immunsuppressiven Zytokinen wie *transforming growth factor*-(TGF)- β 1 durch Tumorzellen beobachtet werden. Erhöhte Plasmaspiegel von TGF- β 1 zeigten dabei eine inverse Korrelation mit der NKG2D-Expression und der lytischen Kapazität von NK-Zellen besagter Patienten.⁸¹ Bei Patienten mit AML konnte eine Hochregulation der DNAM-1-Liganden CD112 und CD155 auf leukämischen Blasten als mögliche Ursache der NK-Zell-Defizienz festgestellt werden. NK-Zellen dieser Patienten zeigten eine verminderte Expression des aktivierenden Korezeptors DNAM-1, welche nach Koinkubation mit den Blasten auch bei NK-Zellen gesunder Spender nachgewiesen werden konnte.⁸²

Im Falle von STS konnte für bereits chemotherapeutisch vorbehandelte Patienten ein Zusammenspiel aus verminderter Expression von aktivierenden Rezeptoren und einer veränderten Zusammensetzung der Subpopulationen von NK-Zellen als wahrscheinlicher Faktor ermittelt werden. Die Ursache der NK-Zell Dysfunktion von Erstlinien-STP-Patienten ist jedoch bisher nicht sicher identifiziert worden.⁵² Vergleicht man das mediane Alter des hier untersuchten Spender- und Patientenkollektivs stößt man auf einen Unterschied von 27 Jahren (Median Spender: 25 Jahre; Patienten: 52 Jahre). Zwar gibt es Daten die eine leichte altersbedingte Abnahme der Zytotoxizität von NK-Zellen zeigen.⁸³ Widersprüchlich dazu sind allerdings normale NK-Zell-Funktionen bei anderen Krebserkrankungen. So konnten bei einem Kollektiv von Nierenzellkarzinompatienten mit einem medianen Alter von 66 Jahren normale Zytotoxizitätswerte gegen K562 gemessen werden.⁵² Weiter ist eine temporäre NK-Zell Dysfunktion im Rahmen von Operationen beschrieben. In der Regel ist die zytotoxische Kapazität dabei innerhalb von 30 Tagen postoperativ vollständig wiederhergestellt.⁵³ Im hier untersuchten Patientenkollektiv wurden die Blutentnahmen stets zu einem späteren postoperativen Zeitpunkt durchgeführt. Vier Patienten waren primär inoperabel. Neben dem Alter können somit auch chirurgische Maßnahmen als Ursache für die beobachtete NK-Zell Dysfunktion ausgeschlossen werden.

5.2 Weichteilsarkome exprimieren GD2

Eine GD2-Expression von STS wurde von Chang et. al. schon Anfang der 90er Jahre beschrieben. Von den insgesamt 60 mittels immunhistologischer Färbung untersuchten Schnittpräparaten zeigten mehr als 90% eine zumindest teilweise Expression von GD2. Eine starke Intensität dieser und einen großen Anteil positiver Zellen war dabei vor allem bei Liposarkomen und Fibrosarkomen zu finden. Für Synovial- und Leiomyosarkome wurden diesbezüglich heterogene Werte gemessen.⁶⁰ In einer relativ neuen Arbeit konnte eine diffuse Expression für Leiomyosarkome bestätigt werden. Dabei waren alle histopathologischen Präparate in der Lage ein Immunzytokin auf der Basis des GD2-

Antikörpers ch14.18 zu binden. Weitere Untersuchungen, die eine therapeutische Anwendung des Zytokins ermöglichen könnten, sind ausstehend.⁸⁴

Darüber hinaus konnte GD2 auch auf einem Teil der hier untersuchten STS-Zelllinien gefunden werden. So zeigten Liposarkomzellen (SW872) eine teilweise starke und Rhabdomyosarkomzellen (A673) eine schwache Expression. Weiter konnte eine bereits beschriebene starke Expression von Ewing-Sarkomzellen (TC-71) bestätigt werden.⁸⁵ An dieser Stelle sei nochmal explizit erwähnt, dass es sich beim Ewing-Sarkom um einen primären Knochentumor handelt, welcher sich von den STS-Entitäten vor allem durch ein besseres Ansprechen auf konventionelle Chemotherapieregimes unterscheidet und somit gesondert zu betrachten ist.⁸⁶

Auf den untersuchten Synovialsarkomzellen und Leiomyosarkomzellen war kein GD2 zu finden.

Aufgrund dieser Ergebnisse und den Informationen zur Expression auf Primärmaterial ist GD2 ein passendes Antigen für eine mögliche immuntherapeutische Behandlung von STS-Patienten mittels Anti-GD2 Antikörpern.

5.3 Verwendung von Anti-GD2 Antikörpern erhöht die Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen mittels ADCC

Die ADCC-vermittelte Lyse von GD2-positiven STS-Zellen durch die Nutzung des Anti-GD2-Antikörpers ch14.18 zeigte sich in den durchgeführten *in vitro*-Versuchen als sehr effektiv. Sowohl durch NK-Zellen gesunder Spender als auch von STS-Patienten konnte im Vergleich zu den äußerst geringen Zytotoxizitätswerten ohne Antikörper eine signifikante Steigerung beobachtet werden. So ließ sich bei Liposarkomzellen (SW872) durch Spender-NK-Zellen mit Hilfe von 10µg/ml ch14.18 bei einer E/T ratio von 50:1 durchschnittlich 46,7% (6,2-fache Steigerung der nicht ADCC-vermittelten Lyse) der maximal möglichen Lyse erreichen. Durch NK-Zellen von STS-Patienten wurde unter gleichen Bedingungen immerhin 33,3% der maximal möglichen Lyse erreicht, was einer relativen Steigerung um den Faktor 3,9 entspricht. Die erreichten Zytotoxizitätswerte bei der Nutzung einer Antikörperkonzentration von 1µg/ml unterschieden sich in beiden Gruppen jeweils nur unwesentlich (Vgl. Abb. 4-15). Angesichts der geringer ausfallenden relativen Steigerung der Zytotoxizität von Patienten-NK-Zellen ist eine Dysfunktion in Form einer verminderten Fähigkeit STS-Zellen mittels ADCC zu lysieren als sehr wahrscheinlich anzusehen. Die Zahl der Messungen war hierbei jedoch zu gering um einen signifikanten Unterschied zu zeigen. In der Literatur gibt es für NK-Zellen von STS-Patienten bis jetzt noch keine Daten für die hier genannte Form der Dysfunktion. Beschrieben ist eine gestörte ADCC bei NK-Zellen von Magenkarzinom-Patienten. Diese zeigten, mit Fortschreiten der Erkrankung, eine immer schwächer werdende Fähigkeit HER-2/neu positive Tumorzellen mit Hilfe von Trastuzumab zu lysieren. Als

Ursache wird dabei eine verminderte Expression von CD16 ζ diskutiert. Bei diesem handelt es sich um ein intrazelluläres Molekül, welches bei der Signal-Transduktion zur Aktivierung der NK-Zellen mittels ADCC phosphoryliert wird. Eine geringere Expression resultiert damit in einer verminderten Zytotoxizität durch ADCC.⁸⁷

Aufgrund der - im Vergleich mit NK-Zellen gesunder Spender zwar geringeren - insgesamt aber sehr ausgeprägten Zunahme der Zytotoxizität von Patienten-NK-Zellen gegen STS-Zellen erscheint die therapeutische Nutzung des Antikörpers bei STS-Patienten vielversprechend. Präklinische Daten zur ADCC durch ch14.18 bei GD2-exprimierenden Neuroblastomzellen und Melanomzellen zeigen sich als mit den hier für STS-Zelllinien gemessenen Werten vergleichbar. Für die Melanom-Zelllinie M21 sind ADCC-vermittelte Lysewerte von knapp 30% bei einer E/T ratio von 50:1 durch Anwendung der auch in dieser Arbeit genutzten Konzentrationen von ch14.18 beschrieben.⁶⁴ Für die Neuroblastom-Zelllinie SK-N-AS sind Lysewerte um 30% bei einer Antikörperkonzentration von 10 μ g/ml und einer E/T ratio von nur 10:1 veröffentlicht.⁶⁵ Jedoch wurden diese mittels eines 20 stündigen ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay erzielt, während die Koinkubation von Effektor- und Targetzellen bei den hier durchgeführten Zytotoxizitätsmessungen stets 4 Stunden betrug. Bei Betrachtung der von NK-Zellen einzelner Spender mittels ADCC erreichten Zytotoxizitätswerte gegen SW872 Liposarkomzellen fällt auf, dass diese teilweise höher waren als der Anteil GD2-exprimierender Zellen der Zelllinie (Vgl. Abb 4-10). So konnten beispielsweise durch NK-Zellen eines Individuums mehr als 80% der maximal möglichen Lyse erreicht werden bei einem Anteil GD2-exprimierender Zellen von nur circa 40%. Ein *off-Target*-Effekt bei dem, durch die Ausschüttung von Perforin und Granzyme durch NK-Zellen im Rahmen der ADCC, neben der Zielzelle auch umliegende, gegebenenfalls GD2-negative, Tumorzellen geschädigt werden können oder durch die erfolgende Zytokinfreisetzung weitere NK-Zellen aktiviert werden ist hier wahrscheinlich. Die in dieser Arbeit als Positivkontrolle genutzte Neuroblastom-Zelllinie LAN-1 zeigte vergleichsweise neben einer Expression von GD2 auf allen Zellen auch eine stärkere Intensität dieser (Vgl. Abbildungen 4.3.3 und 4.3.4). Dennoch deckten sich die mittels ch14.18 erzielten Lysewerte mit den bei SW872 Liposarkomzellen erreichten (nicht dargestellte Daten). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Triggerung der NK-Zell-Aktivität an sich eventuell von größerer Bedeutung für die Zerstörung der Tumorzellen im Ganzen ist, als das Vorhandensein des Tumorantigens auf jeder einzelnen Zelle.

Bei Neuroblastomen wurde die Anwendung einer ch14.18-basierten Immuntherapie erfolgreich etabliert. Diese zeigte sich in klinischen Studien der Standardtherapie im Bezug auf das Gesamtüberleben überlegen, was letzten Endes zur Zulassung führte (Vgl. Kapitel 1.5.1.2).⁶⁶ Infolge der nun ausführlich beschriebenen Vergleichbarkeit der präklinischen

Daten zur ADCC von Neuroblastom-Zelllinien und den hier untersuchten STS-Zelllinien sollte eine klinische Anwendung von ch14.18 auch bei STS erwogen werden.

Im Rahmen der grundsätzlichen Durchführbarkeit einer solchen, sollen im Folgenden die Übertragbarkeit der *in vitro*-Versuchsbedingungen und Ergebnisse auf einen menschlichen Organismus diskutiert werden.

Zum einen sind hierbei die genutzten Antikörperkonzentrationen von Relevanz. Bei therapeutischer Anwendung des Antikörpers bei Kindern mit Neuroblastomen werden 25mg/m² des Antikörpers über 10 Stunden an 4 aufeinander folgenden Tagen infundiert. Die nach der letzten Infusion gemessene Spitzenkonzentration von ch14.18 im Plasma betrug bei 14 untersuchten Patienten durchschnittlich 11µg/ml. 28 Tage nach dem Start der Infusionen betrug sie noch durchschnittlich 0,21µg/ml. Die in dieser Arbeit angewendeten Konzentrationen sind also *in vivo* zumindest im Plasma erreichbar und werden von den Patienten toleriert. Keiner der Patienten musste die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen abbrechen. Der meistens auftretenden Schmerzen während und nach der Infusion konnten mit Opiaten abgefangen werden.⁶³

Weiter besteht Diskussionsbedarf bei der Wahl von E/T ratios bei den Zytotoxizitätsmessungen. Während mit Hilfe von ch14.18 bei einer E/T ratio von 50:1 noch fast die Hälfte der maximal möglichen Lyse von Liposarkomzellen (SW872) erreicht werden konnte, waren es bei der niedrigsten gemessenen E/T ratio von 6,25:1 weniger als 10%. Bei der therapeutischen Anwendung des Antikörpers im Menschen ist eine E/T ratio von 50:1 zumindest bei einer makroskopischen Tumorlast nicht erreichbar. Realistischer erscheint eine relevante E/T ratio im Rahmen einer adjuvanten Therapie bei der nach Resektion des Primärtumors vereinzelte Tumorzellen oder Tumorzellnester das Target sind.

Um eine effektive Behandlung sicherzustellen wird bei der Therapie von Neuroblastomen das Immunsystem zusätzlich stimuliert. In der zugelassenen Kombinationstherapie werden dafür IL-2 und GM-CSF verwendet.⁶⁶ Neben den bekannten stimulatorischen Effekten auf das Immunsystem, wie der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Granulozyten und Makrophagen, ist für GM-CSF auch eine Verstärkung der ADCC beschrieben worden.⁸⁸ IL-2 wirkt, wie bereits beschrieben, aktivierend auf NK-Zellen (Vgl. Kapitel 1.3.1.3). Die Möglichkeit einer solchen Stimulation zur Aktivierung von NK-Zellen, mit der eine Abschwächung der Zytotoxizität bei niedrigen E/T ratios kompensiert werden soll, besteht auch bei STS und soll im folgenden Kapitel (5.4) diskutiert werden.

Mit Hilfe des ebenfalls untersuchten Anti-GD2 Antikörper ME36.1 konnte nur eine schwache ADCC-vermittelte Lyse von STS-Zellen erreicht werden (Vgl. Abb. 4-13). Dies ist damit zu begründen, dass es sich um einen murinen Antikörper handelt. Zwar hat er eine deutlich

höhere Affinität zu GD2 als ch14.18 (Vergleich K_D 19nM vs 77nM). Jedoch ist die Bindungsfähigkeit zwischen murinem Fc-Teils des Antikörpers und dem FcγIIIA-Rezeptor (CD16) auf humanen NK-Zellen gering ausgeprägt. Mueller et. al beschreiben eine durch Chimärisierung des Ursprungsantikörpers 14G2a zu ch14.18 resultierende 50-100fache Erhöhung der von humanen PBMCs vermittelten Zytotoxizität.⁶⁴ Im Falle von ME36.1 resultierten Versuche einer Humanisierung hingegen in einer verminderten Affinität zum GD2-Antigen.⁸⁹ Insgesamt war der Antikörper also wenig geeignet für eine GD2-basierte Immuntherapie für STS, sodass keine weiteren Versuche gemacht wurden.

5.4 Expansion Natürlicher Killerzellen führt zu erhöhter Zytotoxizität

Durch die zusammen mit dem Kooperationspartner Zellwerk GmbH durchgeführte *ex vivo*-Langzeitexpansion zeigte sich unabhängig von einer Nutzung des ch14.18 Antikörpers eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität gegenüber allen untersuchten STS-Zelllinien. So konnten durch expandierte NK-Zellen bei einer E/T ratio von 50:1 durchschnittliche Lysewerte von circa 70% der maximal möglichen Lyse erreicht werden, während mit unstimulierten NK-Zellen bei gleichen Bedingungen Lysewerte von unter 10% erzielt wurden. Auch bei einer E/T ratio von 6,25:1 - bei der für unstimulierte NK-Zellen fast keine Lyseaktivität mehr nachweisbar - konnten noch Werte von circa 40% erreicht werden. (Vgl. Abbildungen 4-18, 4-19 und 4-20). Zusätzlich konnte durch expansionsbedingte Proliferation der 90-fache Wert der Ausgangsmenge an NK-Zellen erreicht werden (unpublizierte Daten, persönliche Kommunikation H. Hoffmeister). Die im Zuge dessen durchgeführte Analyse der Oberflächenmarker-Expression vor und nach der Expansion zeigte eine Zunahme der Expression aktivierender Rezeptoren NKG2D und NKp30, während die CD16-Expression vermindert war (Vgl. Abb. 4-17). Da die Analyse aktivierender Rezeptoren auch Thema einer weiteren Dissertation ist, wird im Rahmen der Diskussion nicht vertiefend darauf eingegangen.

Veröffentlichungen zu Langzeitstimulationen von NK-Zellen berichten ebenfalls über ähnlich erhöhte Zytotoxizitätswerte gegen verschiedene Tumorzellen. Für STS gibt es jedoch noch keinerlei vergleichbare Daten. Huenecke et. al. konnten für Neuroblastomzellen bei einer E/T ratio von 10:1 durchschnittliche Lysewerte von circa 60% der maximal möglichen Lyse (Vgl. SW872 durchschnittliche Lyse: 51,7% bei E/T ratio 12,5:1) durch eine 9 tägige IL-2 Stimulation erreichen. Auch hier wurde eine IL-2 induzierte Hochregulation aktivierender Rezeptoren von NK-Zellen beobachtet.⁹⁰ Im Rahmen einer weiteren Langzeitexpansion der Zellwerk GmbH, bei der neben IL-2 auch IL-15 als Stimulanz genutzt wurde, zeigten die aktivierten NK-Zellen eine nur mäßig erhöhte Zytotoxizität gegenüber Lymphomzellen.⁴⁷

Durch eine zusätzliche Nutzung des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 konnte bei den beiden untersuchten GD2-exprimierenden Zelllinien, sowie erwartungsgemäß auch bei den GD2-negativen Leiomyosarkomzellen, kaum eine zusätzliche ADCC-vermittelte Lyse beobachtet werden (Vgl. Abbildungen 4-21, 4-24 und 4-25).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist die Verminderung der, für die ADCC essentiellen, CD16-Expression von expandierten NK-Zellen. Eine Runterregulation dieser im Zuge einer *in vitro*-Stimulation von NK-Zellen durch IL-2 und sowie auch durch IL-15 ist in der Literatur bereits beschrieben worden.⁴⁴ Auf der anderen Seite gibt es aber auch Daten zu synergistischen Effekten von Interleukin-basierter Stimulation und ADCC im Bezug auf die lytische Aktivität von NK-Zellen. Dies ist beispielsweise für Zelllinien von nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC)⁹¹ und Lymphom gezeigt worden. Die zusätzliche Nutzung des Anti-CD20 Antikörpers Rituximab konnte bei zuvor mittels IL-2 stimulierten NK-Zellen die zytotoxische Kapazität gegenüber Lymphomzellen stark erhöhen. Im Anschluss an die mehrtägige Stimulation, welche die CD16-Expression der NK-Zellen in diesem Falle kaum beeinflusste, wurden bei einer E/T ratio von 20:1 Lysewerte von circa 20% der maximal möglichen Lyse erreicht. Bei zusätzlicher Rituximabgabe erhöhten sich diese auf über 70%.⁴⁷ Eine Erhöhung in diesem Maße konnte bei den untersuchten STS-Zelllinien nicht festgestellt werden. Allerdings war die durchschnittlich gemessene Zytotoxizität der expandierten NK-Zellen hier in vergleichbaren E/T ratios bereits ohne Antikörper schon deutlich höher als bei beschriebener Lymphom-Zelllinie und das Potenzial für eine zusätzliche Erhöhung der Zytotoxizität durch ADCC somit geringer. Diese Beobachtungen legen also nahe, dass bei einer so starken Aktivierung der NK-Zellen eine zusätzliche Stimulation via CD16 nicht mehr effektiv ist. Nach einer passageren Kryokonservierung der expandierten NK-Zellen zeigte sich im Rahmen anschließender Zytotoxizitätsmessungen interessanterweise - bei einer insgesamt deutlich schwächeren lytischen Aktivität gegen Liposarkomzellen - ein stärkerer Effekt des Antikörpers. Möglicherweise hat die Kryokonservierung einen negativen Einfluss auf den Aktivierungsgrad von NK-Zellen. Ausgehend davon würde in diesem Falle wieder mehr Spielraum für eine CD16 abhängige ADCC-vermittelte Lyse bestehen, was den verstärkten Effekt des Antikörpers erklären würde (Vgl. Abb. 4-22).

Vor Allem die, auch in niedrigen E/T ratios, sehr ausgeprägten Zytotoxizitätswerte expandierter NK-Zellen stellen eine gute Voraussetzung für eine Anwendung *in vivo* dar. Ein, in diesem Ansatz *in vitro* simulierter, adoptiver Zelltransfer von stimulierten NK-Zellen, ist möglicherweise eine aussichtsreiche Therapieoption für STS-Patienten und sollte deshalb in der Klinik untersucht werden.

Ein solches Verfahren wurde bei anderen Tumorentitäten bereits durchgeführt. In verschiedenen klinischen Studien wurden dafür sowohl autologe als auch allogene NK-Zellen verwendet. Autologe *ex vivo* mittels IL-2 expandierte NK-Zellen von Patienten mit metastasiertem Melanom und Nierenzellkarzinom waren zwar in der Lage Zelllinien der jeweiligen Entität effektiv zu lysieren. In einer Phase I Studie konnte durch die systemische Verabreichung der Zellen *in vivo* jedoch keine Tumorregression erreicht werden. Des Weiteren zeigten die verabreichten NK-Zellen nach mehrtägiger Zirkulation bei erneuter Entnahme eine reduzierte Lysefähigkeit *in vitro* und eine verminderte NKG2D-Expression.⁹² Dies führt zu der Annahme, dass autologe NK-Zellen Tumorzellen im Rahmen des Immun-Escape-Phänomens (Vgl. Kapitel 1.2.1) bei fortgeschrittener Erkrankung nur eingeschränkt erkennen und zerstören können. Ursächlich hierfür könnte ein Antigen-Shedding der Tumorzellen sein. Dabei werden Membranantigene darunter NK-Zell-Liganden wie MICA/MICB von der Zellmembran gelöst und ins Interstitium abgegeben. NK-Zellen binden mit ihren passenden Rezeptoren an diese freien Liganden, ohne dass an der Zielzelle eine Wirkung ausgelöst werden kann. Durch die damit induzierte Immunsuppression kommt es zu einer reflektorischen Runterregulation aktivierender Rezeptoren wie NKG2D und verminderter lytischer Aktivität von NK-Zellen.⁹³

Mit allogenen NK-Zellen konnten vergleichsweise vielversprechendere Immuntherapien durchgeführt werden.⁴⁶ Die *ex vivo*-Stimulation von NK-Zellen haploidentischer Spender mittels IL-15 zeigte beim fortgeschrittenen NSCLC erste Erfolge. In einer Phase I Studie erwies sich die wiederholte Verabreichung der NK-Zellen in Kombination mit einer Chemotherapie als sicher und konnte bei der Hälfte der Patienten mindestens eine Stabilisierung der Erkrankung bewirken. Bei zwei Patienten wurde sogar eine partielle Remission erreicht.⁹⁴

Anders als bei autologen NK-Zellen kann bei der Verabreichung von allogenen NK-Zellen ein *Graft versus Malignancy*-(GvM)-Effekt beobachtet werden. Aufgrund eines möglichen KIR-Mismatches zwischen Spender und Empfänger kann ein - bei autologen NK-Zellen vorherrschendes - inhibitorisches Signal ausbleiben, sodass es zu einer signifikanten lytischen NK-Zell-Aktivität kommt und Tumorzellen lysiert werden können. Eine generalisierte *Graft versus Host Disease* (GVHD) konnte in Follow-up-Untersuchungen hingegen bei keinem der Patienten beobachtet werden.⁹⁴

5.5 GD2 als mögliches Marker-Antigen für Cancer stem cells

Cancer stem cells (CSCs) wurden erstmals 1997 bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) entdeckt.⁹⁵ Hierbei handelt es sich um Krebszellen, die typische Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung und Differenzierungspotenzial aufweisen. Sie sind in vielerlei Hinsicht ähnlich wie normale Stammzellen und entstehen vermutlich durch onkogene Mutation aus diesen. Um ihre Integrität zu sichern, zeigen CSCs unter anderem

eine vermehrte Aktivität von Membranpumpen und Enzymen wie beispielsweise der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), die toxische Substanzen, wie Zytostatika, entfernen beziehungsweise abbauen können. Es wird davon ausgegangen, dass sie Tumoren nicht nur initiieren sondern auch für Metastasierung und Rezidive verantwortlich sind.^{96,97}

Im Rahmen einer erfolgreichen Krebstherapie ist es deshalb notwendig CSCs vollständig zu eliminieren. Oftmals befinden sich diese aber in einem Stadium der prämaternen Seneszenz. Dabei handelt es sich vereinfacht gesagt um ein Zellstress-induzierten temporären Ruhezustand bei dem die Zellen zwar metabolisch aber nicht mitotisch aktiv sind. Aufgrund fehlender Zellteilung können CSCs in diesem Zustand durch konventionelle Chemotherapien nicht angegriffen werden. Darüber hinaus kann eine Seneszenz durch die Anwendung einer solchen sogar induziert werden.⁹⁸

Ziel ist es deshalb spezifische Antigene von CSCs zu identifizieren, welche als Target für eine mögliche Immuntherapie genutzt werden können, die sich direkt gegen CSCs richtet. Somit soll eine effektivere Zerstörung dieser gewährleistet werden was letzten Endes eine Verringerung von Rezidivraten und Metastasierung bedeuten könnte.

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit stellen sich die Fragen ob es sich bei STS um von Stammzellen ausgehende Malignitäten handelt und ob GD2 ein mögliches Marker-Antigen von CSCs ist.

Aufgrund der Heterogenität verschieden STS-Subtypen ist es schwierig diese Fragestellung für alle STS einheitlich zu beantworten. Vielmehr müssen Subtypen einzeln untersucht werden. Aus Voruntersuchungen existieren Hinweise, dass sowohl Liposarkom⁹⁶ als auch Synovialsarkom Krebserkrankungen sein könnten die auf CSCs zurückzuführen sind. Bei letzterem wird eine Mutation multipotenter mesenchymaler Stammzellen als Ursprung der Erkrankung angenommen.⁹⁹

In einer weiteren Untersuchung wurde auf mesenchymalen Stammzellen (MSC) im Knochenmark eine hohe Expression von GD2 gezeigt.¹⁰⁰ Dies deutet darauf hin, dass GD2 möglicherweise auch auf CSCs von STS exprimiert wird.

Für andere Tumorentitäten ist bereits ein Zusammenhang zwischen GD2 und CSCs hergestellt worden. Batulla et. al. konnten GD2 als Marker-Antigen von Brustkrebs-CSCs ausmachen.¹⁰¹ Ebenso wurde auf Brustkrebs CSCs die Expression von CD133, einem Antigen welches auf Krebs-initiierenden Zellen verschiedener Tumorentitäten beschrieben ist, gefunden.¹⁰² Dieses ist wiederum als CSC-spezifisches Antigen für die in dieser Arbeit genutzte GD2-exprimierende Liposarkom-Zelllinie SW872 beschrieben.⁹⁶

Eine Koexpression von GD2 und CD133 auf CSCs von STS ist also durchaus vorstellbar. Diese würde die Bedeutung von GD2 als Targetantigen - auch wenn es sich schlussendlich nicht um ein spezifisches Marker-Antigen für CSCs handeln sollte - in der Therapie von STS

noch weiter steigern. Um eine CD133-Expression von Sarkomzellen durchflusszytometrisch bestimmen zu können ist eine vorherige Kultivation dieser in einem speziellen Stammzellmedium notwendig. Die notwendigen Kulturbedingungen konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden, sodass die Experimente zur Messung einer Koexpression von GD2 und CD133 auf besagter Liposarkom-Zelllinie scheiterten.

Infolge der GD2-basierten Sortierung dieser zeigte sich im Verlauf eine hohe Regenerationsfähigkeit GD2-positiver Zellen aus der GD2-negativen Subpopulation (Vgl. Abbildungen 4-26 und 4-27). Angenommen es handelt sich um ein spezifisches Antigen von CSCs deutet dies darauf hin, dass sich GD2-exprimierende CSCs aus GD2-negativen Tumorzellen, die keine Stammzell-Eigenschaften haben, regenerieren können. Ein solcher Sachverhalt ist für CSCs äußerst untypisch. Andererseits muss dabei beachtet werden, dass die negative Subpopulation nach der Sortierung noch einen minimalen Anteil an GD2-positiven Zellen enthielt, der die beschriebene Regeneration ebenfalls initiiert haben könnte. Dies scheint wiederum unwahrscheinlich, da eine so hohe Teilungsrate für CSCs - die aufgrund von Seneszenz nur geringe mitotische Aktivität zeigen - nicht zu erwarten ist. Weiter spricht der persistierende hohe Anteil an GD2-exprimierenden Zellen in der positiven Subpopulation dafür, dass es sich bei diesen um differenzierte Zellen handelt.

Ob GD2 nun tatsächlich ein Marker-Antigen auf CSCs von STS beziehungsweise verschiedener Subtypen von STS ist, kann anhand der vorliegenden Literatur und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Es handelt sich aber um eine Fragestellung von großer Wichtigkeit, die mittels einer Einzelzellanalyse zuverlässig beantwortet werden könnte.

5.6 Ausblick: Möglichkeit der Beeinflussung der GD2-Expression von Weichteilsarkomen *in vivo*

Da sich das GD2-Antigen, in den hier durchgeführten *in vitro*-Experimenten, als ein hervorragendes Target für eine mögliche Immuntherapie bei STS eignete, stellt sich die Frage wie seine Expression in Tumorzellen reguliert wird und wie die Regulation beeinflusst werden kann.

Einerseits zeigte sich bei den Zelllinien TC-71 und SW872 sowie auch bei Neuroblastom-Zelllinien unter vergleichbaren Bedingungen eine ähnlich starke GD2-vermittelte Zytotoxizität trotz unterschiedlichem Expressionslevel. Infolge der Sortierung von SW872 stellte sich jedoch heraus, dass die Liposarkom-Zellen Subpopulation mit einer schwachen GD2-Expression im Vergleich zur Ausgangspopulation und zur Subpopulation mit erhöhter Expression für eine Anti-GD2-vermittelte Lyse durch NK-Zellen weniger angreifbar waren (Vgl. Abb. 4.29). Dies zeigt, dass für eine effiziente gegen GD2 gerichtete Immuntherapie zumindest ein gewisses Basislevel an Expression vorhanden sein muss. Eine mögliche

Induktion des Antigens im Rahmen der Therapie könnte deshalb ein erstrebenswertes Ziel sein.

Der letzte Schritt der GD2-Synthese wird durch das Enzym β -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase (GM2/GD2-Synthase) katalysiert. Das für dieses Enzym codierende Gen befindet sich auf Chromosom 12.¹⁰³ Zwar weisen alle GD2-exprimierenden Zelllinien die in dieser Arbeit untersucht wurden eine Reihe verschiedener chromosomaler Polyploidien auf. Eine Polyploidie von Chromosom 12, die eine Überexpression aufgrund einer erhöhten Gendosis verursachen könnte, ist jedoch für keine beschrieben. Anlässlich der Charakterisierung der Neuroblastom-Zelllinie LS wurde sogar nur eine Kopie von diesem pro Zelle gefunden.¹⁰⁴ Bei der FISH der GD2-positiven und GD2-negativen Subpopulation von SW872 wurde eine Quantifizierung von Chromosom 12 - aufgrund der Tatsache, dass keine Anomalien in der Referenzdatenbank vorbeschrieben sind⁷⁶ - nicht durchgeführt. Unterschiede zeigten die Subpopulationen hinsichtlich der Polyploidie von Chromosom 8 (Vgl. Tabelle 4-7). Weiter sei gesagt dass eine erhöhte Gendosis (infolge einer Polyploidie) nicht zwingend Expressionsunterschiede herbeiführt. Vielmehr können hier noch epigenetische Effekte wie DNA-Methylierung eine Rolle spielen, deren mögliche Einflüsse auf die GD2-Expression von Tumorzellen noch genauer untersucht werden müssen.

Eine Hochregulation von GD2 aufgrund von metabolischem Stress ist bei Brustkrebs-CSCs kürzlich beschrieben worden. Durch Kultivierung in einem nährstoffarmen Medium konnte dabei nach 4 Tagen eine signifikante Zunahme des Anteils an GD2-exprimierenden Zellen erreicht werden.¹⁰⁵ In dieser Arbeit wurde diesbezüglich die Möglichkeit einer Induktion von GD2 auf Sarkom-Zelllinien durch Zellstress im Rahmen von Hyperthermie untersucht. Hierbei zeigte jedoch keine der Zelllinien im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation bei 43°C oder 41,8°C eine relevante Änderung der GD2-Expression (nicht dargestellte Daten). Darüber hinaus ist zu Regulation und Induktion von GD2 relativ wenig bekannt. Yoshida et. al. konnten nach Einbringung einer GD3-Synthase cDNA in eine SCLC-Zelllinie eine erhöhte Expression von GD3 und GD2 bei den transfizierten Zellen beobachten. Das Enzym katalysiert dabei die Reaktion von GM3 zu GD3, der Vorstufe von GD2. Interessanterweise zeichneten sich diese Zellen - im Vergleich mit Zellen der Ausgangszelllinie - durch ein schnelleres und invasiveres Wachstum aus.¹⁰⁶ Zudem wird vermutet, dass Ganglioside die Immunantwort von Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten beeinträchtigen können. Nach Inkubation mit Gangliosid-haltigem Überstand aus dem Tumorbett von Nierenzellkarzinomen zeigten diese eine erhöhte Apoptoseneigung.¹⁰⁷ Sollte GD2 also in der Lage sein eine Dysfunktion von T-Zellen zu induzieren könnte dem Antigen damit möglicherweise auch eine kritische Rolle bei Krebsentstehung und Immune-Escape zukommen. Dementsprechend ist

die therapeutische Relevanz einer Induktion von GD2 sorgfältig zu prüfen, da diese unter Umständen auch Schaden anrichten könnte.

Zusammenfassend handelt es sich bei GD2 um ein interessantes Antigen für immuntherapeutische Interventionen bei STS-Patienten, dessen genaue Charakteristika weiter erforscht werden sollten. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der genauen Funktion bei Krebserkrankungen, der Regulation und möglichen Interaktionen mit dem Immunsystem.

6 Zusammenfassung

Weichteilsarkome (STS) sind seltene maligne Tumoren mesenchymalen Ursprungs, die überall im Körper von Strukturen des Fett-, Muskel-, oder Stützgewebes ausgehen können. Therapiestandard ist die Resektion mit ausreichenden Sicherheitsabständen. Zur Verbesserung der Therapieergebnisse werden bei Hochrisiko-Patienten multimodale Konzepte verfolgt, welche auch (neo)adjuvante Radio- und Chemotherapien beinhalten. Trotzdem bleibt die Prognose für einen signifikanten Anteil dieser Patienten weiterhin schlecht, weshalb innovative, gegebenenfalls auch komplementäre therapeutische Optionen dringend notwendig sind. Immunmodulierende Therapiestrategien zeigen bei anderen Tumorentitäten bereits beeindruckende Ergebnisse und haben einen von der klassischen Chemotherapie deutlich abweichenden Wirkmechanismus.

In dieser Arbeit wurden auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) basierende immuntherapeutische Strategien für STS evaluiert. Als Ausgangspunkt einer immuntherapeutischen Intervention sind NK-Zellen unter anderem auch deshalb sehr interessant, weil für sie eine Dysfunktion im Zusammenhang mit einer STS-Erkrankung beschrieben ist. Ziel war es zwei Strategien zu prüfen, um die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen STS-Zellen zu steigern. Untersucht wurden dabei die Nutzung von monoklonalen Antikörpern gegen GD2, einem Gangliosid welches häufig von STS Subentitäten exprimiert wird, sowie eine Interleukin-basierte Langzeitexpansion von NK-Zellen.

Bei der Untersuchung der aus Blut von Spendern und Patienten isolierten NK-Zellen bestätigte sich die, gegenüber dem Standard-NK-Target K562 bereits beschriebene, verminderte lytische Aktivität der Patienten-NK-Zellen. Ein Vergleich der Zytotoxizität gegenüber STS-Zelllinien zwischen Spender- und Patienten-NK-Zellen war nicht möglich, da für keine der beiden Gruppen eine relevante Lyse der Zielzellen gezeigt werden konnte.

Die Nutzung des Anti-GD2 Antikörpers ch14.18 führte bei beiden Gruppen zu einer signifikanten Zunahme der Zytotoxizität gegenüber GD2-exprimierenden STS-Zelllinien. Tendenziell war die Zunahme bei Patienten-NK-Zellen geringer ausgeprägt.

Durch die Langzeitexpansion wurde eine erhebliche Menge aktivierter NK-Zellen gesunder Spender generiert. Diese zeigten unabhängig von einer Antikörper-Nutzung eine hochgradig ausgeprägte Zytotoxizität gegenüber STS-Zelllinien. Ein synergistischer Effekt bei zusätzlicher Nutzung des Antikörpers ch14.18 war zumindest bei hohen E/T ratios jedoch nicht vorhanden.

Die hier mit beiden Augmentationsverfahren erhobenen präklinischen Daten stellen - gegebenenfalls auch in Kombination - eine vielversprechende Therapieoption für Patienten mit STS dar. Die Daten unterstützen die Weiterentwicklung von NK-Zell-basierten immuntherapeutischen Ansätzen für die Therapie von STS-Patienten mit hohem Rezidivrisiko.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **65**, 87-108, doi:10.3322/caac.21262 (2015).
- 2 Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2015. (2016).
- 3 Statistisches Bundesamt. Gesundheit - Krankheitskosten 2002 - 2008.
- 4 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians* **65**, 5-29, doi:10.3322/caac.21254 (2015).
- 5 Clark, M. A., Fisher, C., Judson, I. & Thomas, J. M. Soft-tissue sarcomas in adults. *The New England journal of medicine* **353**, 701-711, doi:10.1056/NEJMr041866 (2005).
- 6 Schütte, J. B., V.; Hartmann, J.T.; Issels, R.D.; Reichardt, P.; Tunn, P.U. Onkopedia Leitlinie für Weichteilsarkome. *Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie* (2011).
- 7 The International Agency for Research on Cancer. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone (IARC WHO Classification of Tumours). *IARC Press* (2002).
- 8 Hardell, L., Eriksson, M. & Degerman, A. Metaanalysis of 4 Swedish case-control studies on exposure to pesticides as risk-factor for soft-tissue sarcoma including the relation to tumor-localization and histopathological type. *International journal of oncology* **6**, 847-851 (1995).
- 9 Brady, M. S., Gaynor, J. J. & Brennan, M. F. Radiation-associated sarcoma of bone and soft tissue. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* **127**, 1379-1385 (1992).
- 10 Clark, M. A. & Thomas, J. M. Portsite recurrence after laparoscopy for staging of retroperitoneal sarcoma. *Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques* **13**, 290-291 (2003).
- 11 Coindre, J. M. *et al.* Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Cancer* **91**, 1914-1926 (2001).
- 12 Greene, F. L. *et al.* AJCC cancer staging manual. 7th ed. *New York: Springer-Verlag* (2010).
- 13 Stojadinovic, A. *et al.* Primary adult soft tissue sarcoma: time-dependent influence of prognostic variables. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 4344-4352 (2002).
- 14 Casali, P. G. & Blay, J. Y. Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **21 Suppl 5**, v198-203, doi:10.1093/annonc/mdq209 (2010).
- 15 Alldinger, I. *et al.* Prognosis and treatment of primary deep soft tissue sarcomas. *Anticancer research* **27**, 2759-2764 (2007).
- 16 Wendtner, C. M., Delank, S. & Eich, H. [Multimodality therapy concepts for soft tissue sarcomas]. *Der Internist* **51**, 1388-1396, doi:10.1007/s00108-010-2672-8 (2010).
- 17 Issels, R. D. *et al.* Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *The Lancet. Oncology* **11**, 561-570, doi:10.1016/s1470-2045(10)70071-1 (2010).
- 18 Casali, P. G. Adjuvant chemotherapy for soft tissue sarcoma. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting* **35**, e629-633, doi:10.14694/EdBook_AM.2015.35.e629 (2015).
- 19 Italiano, A. *et al.* Effect of adjuvant chemotherapy on survival in FNCLCC grade 3 soft tissue sarcomas: a multivariate analysis of the French Sarcoma Group Database. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **21**, 2436-2441, doi:10.1093/annonc/mdq238 (2010).
- 20 Woll, P. J. *et al.* Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and lenograstim for resected soft-tissue sarcoma (EORTC 62931): a multicentre

- randomised controlled trial. *The Lancet. Oncology* **13**, 1045-1054, doi:10.1016/s1470-2045(12)70346-7 (2012).
- 21 Chao, J., Chow, W. A. & Somlo, G. Novel targeted therapies in the treatment of soft-tissue sarcomas. *Expert review of anticancer therapy* **10**, 1303-1311, doi:10.1586/era.10.100 (2010).
 - 22 Verweij, J. *et al.* Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet (London, England)* **364**, 1127-1134, doi:10.1016/s0140-6736(04)17098-0 (2004).
 - 23 van der Graaf, W. T. *et al.* Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet (London, England)* **379**, 1879-1886, doi:10.1016/s0140-6736(12)60651-5 (2012).
 - 24 Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* **3**, 991-998, doi:10.1038/ni1102-991 (2002).
 - 25 Khong, H. T. & Restifo, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature immunology* **3**, 999-1005, doi:10.1038/ni1102-999 (2002).
 - 26 Ichim, C. V. Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy. *Journal of translational medicine* **3**, 8, doi:10.1186/1479-5876-3-8 (2005).
 - 27 Davis, I. D., Jefford, M., Parente, P. & Cebon, J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *Journal of leukocyte biology* **73**, 3-29 (2003).
 - 28 Herr, H. W. & Morales, A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *The Journal of urology* **179**, 53-56, doi:10.1016/j.juro.2007.08.122 (2008).
 - 29 Maude, S. L. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England journal of medicine* **371**, 1507-1517, doi:10.1056/NEJMoa1407222 (2014).
 - 30 Tsai, K. K. & Daud, A. I. The Role of Anti-PD-1/PD-L1 Agents in Melanoma: Progress to Date. *Drugs* **75**, 563-575, doi:10.1007/s40265-015-0376-z (2015).
 - 31 Sutlu, T. & Alici, E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *Journal of internal medicine* **266**, 154-181, doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02121.x (2009).
 - 32 Sanchez, C. J. *et al.* Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **60**, 1-13, doi:10.1007/s00262-010-0898-x (2011).
 - 33 Gorelik, E., Wiltrott, R. H., Okumura, K., Habu, S. & Herberman, R. B. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **30**, 107-112 (1982).
 - 34 Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461-469, doi:10.1182/blood-2007-09-077438 (2008).
 - 35 Aptsiauri, N. *et al.* Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Advances in experimental medicine and biology* **601**, 123-131 (2007).
 - 36 Karre, K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scandinavian journal of immunology* **55**, 221-228 (2002).
 - 37 Lanier, L. L. NK cell recognition. *Annual review of immunology* **23**, 225-274, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526 (2005).
 - 38 Kruse, P. H., Matta, J., Ugolini, S. & Vivier, E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology and cell biology* **92**, 221-229, doi:10.1038/icb.2013.98 (2014).
 - 39 Nausch, N. & Cerwenka, A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* **27**, 5944-5958, doi:10.1038/onc.2008.272 (2008).
 - 40 Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S. & Sondel, P. M. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* **6**, 368, doi:10.3389/fimmu.2015.00368 (2015).
 - 41 Smyth, M. J. *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology* **42**, 501-510, doi:10.1016/j.molimm.2004.07.034 (2005).

- 42 Phillips, J. H., Gemlo, B. T., Myers, W. W., Rayner, A. A. & Lanier, L. L. In vivo and in vitro activation of natural killer cells in advanced cancer patients undergoing combined recombinant interleukin-2 and LAK cell therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **5**, 1933-1941 (1987).
- 43 Konjevic, G., Mirjagic Martinovic, K., Vuletic, A. & Radenkovic, S. Novel aspects of in vitro IL-2 or IFN-alpha enhanced NK cytotoxicity of healthy individuals based on NKG2D and CD161 NK cell receptor induction. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **64**, 663-671, doi:10.1016/j.biopha.2010.06.013 (2010).
- 44 Hromadnikova, I., Pirkova, P. & Sedlackova, L. Influence of in vitro IL-2 or IL-15 alone or in combination with Hsp-70-derived 14-mer peptide (TKD) on the expression of NK cell activatory and inhibitory receptors. *Mediators of inflammation* **2013**, 405295, doi:10.1155/2013/405295 (2013).
- 45 Konjevic, G., Vuletic, A. & Mirjagic Martinovic, K. Natural killer cell receptors: alterations and therapeutic targeting in malignancies. *Immunologic research*, doi:10.1007/s12026-015-8695-4 (2015).
- 46 Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R. & Tian, Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular & molecular immunology* **10**, 230-252, doi:10.1038/cmi.2013.10 (2013).
- 47 Friedrichs, B. B., C.; Ullrich, C.; Ried, C.; Sinelnikov, E.; Uharek, L., Hoffmeister, H. *Expansion of CD3 negative CD56 positive NK Cells for repeated clinical application in a GMP Compliant Process Using a Novel Bioreactor System*, <http://www.zellwerk.biz/poster_EBMT_2012.pdf Access Date: 22.02.2017> (2012).
- 48 Konjevic, G., Jurisic, V., Banicevic, B. & Spuzic, I. The difference in NK-cell activity between patients with non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *British journal of haematology* **104**, 144-151 (1999).
- 49 Verhoeven, D. H. *et al.* NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. *Molecular immunology* **45**, 3917-3925, doi:10.1016/j.molimm.2008.06.016 (2008).
- 50 Garcia-Iglesias, T. *et al.* Low Nkp30, Nkp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC cancer* **9**, 186, doi:10.1186/1471-2407-9-186 (2009).
- 51 Fauriat, C. *et al.* Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* **109**, 323-330, doi:10.1182/blood-2005-08-027979 (2007).
- 52 Bucklein, V. *et al.* Progressive natural killer cell dysfunction associated with alterations in subset proportions and receptor expression in soft-tissue sarcoma patients. *Oncoimmunology* **5**, e1178421, doi:10.1080/2162402x.2016.1178421 (2016).
- 53 Iannone, F. *et al.* Effect of surgery on pancreatic tumor-dependent lymphocyte asset: modulation of natural killer cell frequency and cytotoxic function. *Pancreas* **44**, 386-393, doi:10.1097/mpa.0000000000000288 (2015).
- 54 Menard, C. *et al.* Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. *Cancer research* **69**, 3563-3569, doi:10.1158/0008-5472.can-08-3807 (2009).
- 55 Lammie, G., Cheung, N., Gerald, W., Rosenblum, M. & Cordoncardo, C. Ganglioside gd(2) expression in the human nervous-system and in neuroblastomas - an immunohistochemical study. *International journal of oncology* **3**, 909-915 (1993).
- 56 Sha, S. *et al.* Deficits in cognitive function and hippocampal plasticity in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Hippocampus* **24**, 369-382 (2014).
- 57 Sheikh, K. A. *et al.* Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7532-7537 (1999).

- 58 Ahmed, M. & Cheung, N. K. Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *FEBS letters* **588**, 288-297, doi:10.1016/j.febslet.2013.11.030 (2014).
- 59 Wu, Z. L., Schwartz, E., Seeger, R. & Ladisch, S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer research* **46**, 440-443 (1986).
- 60 Chang, H. R., Cordon-Cardo, C., Houghton, A. N., Cheung, N. K. & Brennan, M. F. Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas. *Cancer* **70**, 633-638 (1992).
- 61 Cheever, M. A. *et al.* The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 5323-5337, doi:10.1158/1078-0432.ccr-09-0737 (2009).
- 62 Soman, G. *et al.* Analytical characterization of ch14.18: a mouse-human chimeric disialoganglioside-specific therapeutic antibody. *mAbs* **4**, 84-100, doi:10.4161/mabs.4.1.18566 (2012).
- 63 Desai, A. V. *et al.* Pharmacokinetics of the chimeric anti-GD2 antibody, ch14.18, in children with high-risk neuroblastoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **74**, 1047-1055, doi:10.1007/s00280-014-2575-9 (2014).
- 64 Mueller, B. M., Romerdahl, C. A., Gillies, S. D. & Reisfeld, R. A. Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **144**, 1382-1386 (1990).
- 65 Zeng, Y. *et al.* Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Molecular immunology* **42**, 1311-1319, doi:10.1016/j.molimm.2004.12.018 (2005).
- 66 Yu, A. L. *et al.* Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **363**, 1324-1334, doi:10.1056/NEJMoa0911123 (2010).
- 67 Dinutuximab approved for high-risk neuroblastoma. *Cancer discovery* **5**, Of5, doi:10.1158/2159-8290.cd-nb2015-044 (2015).
- 68 Saleh, M. N. *et al.* Phase I trial of the chimeric anti-GD2 monoclonal antibody ch14.18 in patients with malignant melanoma. *Human antibodies and hybridomas* **3**, 19-24 (1992).
- 69 Thurin, J. *et al.* Monoclonal antibody-defined correlations in melanoma between levels of GD2 and GD3 antigens and antibody-mediated cytotoxicity. *Cancer research* **47**, 1229-1233 (1987).
- 70 Iliopoulos, D. *et al.* Inhibition of metastases of a human melanoma xenograft by monoclonal antibody to the GD2/GD3 gangliosides. *Journal of the National Cancer Institute* **81**, 440-444 (1989).
- 71 ClinicalTrials.gov. *Search for Clinical Studies on ME36.1* <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results/refine?term=ME36.1> Access Date: 06.01.2017> (
- 72 EU Clinical Trials Register. *Search for Clinical Studies on ME36.1*, <<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=ME36.1> Access Date: 06.01.2017> (
- 73 GmbH-HiPer-Gruppe, Z. Z® *RP Technologie*, <http://zellwerk.biz/prod_biostat.htm Access Date: 16.12.2016> (
- 74 Gall, J. G. & Pardue, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **63**, 378-383 (1969).
- 75 Ramakrishna, S. G., S.; Morgan, R.; Dotti, G.; Brenner, MK.; Orentas, RJ.; Mackall, CL. *Can the well-credentialed neuroblastoma tumor antigen GD2 be exploited for T cell based immunotherapy of pediatric sarcomas?*, <http://media4.asco.org/102/6815/60435/60435_poster_big_1.jpg Access Date: 05.12.2016> (
- 76 (ATCC), A. T. C. C. SW 872 [SW-872, SW872] (ATCC® HTB-92™), <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-92.aspx?geo_country=de-culturemethod Access Date: 15.12.2016> (

- 77 Boerman, G. H. *et al.* Role of NKG2D, DNAM-1 and natural cytotoxicity receptors in cytotoxicity toward rhabdomyosarcoma cell lines mediated by resting and IL-15-activated human natural killer cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **64**, 573-583, doi:10.1007/s00262-015-1657-9 (2015).
- 78 Tsukahara, T. *et al.* Prognostic significance of HLA class I expression in osteosarcoma defined by anti-pan HLA class I monoclonal antibody, EMR8-5. *Cancer science* **97**, 1374-1380, doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00317.x (2006).
- 79 Stangl, S., Gross, C., Pockley, A. G., Asea, A. A. & Multhoff, G. Influence of Hsp70 and HLA-E on the killing of leukemic blasts by cytokine/Hsp70 peptide-activated human natural killer (NK) cells. *Cell stress & chaperones* **13**, 221-230, doi:10.1007/s12192-007-0008-y (2008).
- 80 Multhoff, G. *et al.* A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **61**, 272-279 (1995).
- 81 Lee, J. C., Lee, K. M., Kim, D. W. & Heo, D. S. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 7335-7340 (2004).
- 82 Sanchez-Correa, B. *et al.* Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunology and cell biology* **90**, 109-115, doi:10.1038/icb.2011.15 (2012).
- 83 Hazeldine, J., Hampson, P. & Lord, J. M. Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Aging cell* **11**, 751-759, doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00839.x (2012).
- 84 Ziebarth, A. J., Felder, M. A., Harter, J. & Connor, J. P. Uterine leiomyosarcoma diffusely express disialoganglioside GD2 and bind the therapeutic immunocytokine 14.18-IL2: implications for immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **61**, 1149-1153, doi:10.1007/s00262-012-1267-8 (2012).
- 85 Kailayangiri, S. *et al.* The ganglioside antigen G(D2) is surface-expressed in Ewing sarcoma and allows for MHC-independent immune targeting. *British journal of cancer* **106**, 1123-1133, doi:10.1038/bjc.2012.57 (2012).
- 86 Dirksen, U. B., T.; Hummel, Y.; Jürgens, H.; Reichardt, P.; Schütte, J. Onkopedia Leitlinie für Ewing Sarkome. *Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie* (2012).
- 87 Kono, K. *et al.* Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer. *Cancer research* **62**, 5813-5817 (2002).
- 88 Kushner, B. H. & Cheung, N. K. GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma. *Blood* **73**, 1936-1941 (1989).
- 89 Pichla, S. L., Murali, R. & Burnett, R. M. The crystal structure of a Fab fragment to the melanoma-associated GD2 ganglioside. *Journal of structural biology* **119**, 6-16, doi:10.1006/jsbi.1997.3857 (1997).
- 90 Huenecke, S. *et al.* IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16+ and CD16- subpopulations and in vivo influence after haploidentical NK cell infusion. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **33**, 200-210, doi:10.1097/CJI.0b013e3181bb46f7 (2010).
- 91 Kurai, J. *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 1552-1561, doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-1726 (2007).
- 92 Parkhurst, M. R., Riley, J. P., Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 6287-6297, doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-1347 (2011).

- 93 Pogge von Strandmann, E., Shatnyeva, O. & Hansen, H. P. NKp30 and its ligands: emerging players in tumor immune evasion from natural killer cells. *Annals of translational medicine* **3**, 314, doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.08 (2015).
- 94 Iliopoulou, E. G. *et al.* A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **59**, 1781-1789, doi:10.1007/s00262-010-0904-3 (2010).
- 95 Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* **3**, 730-737 (1997).
- 96 Stratford, E. W. *et al.* Liposarcoma Cells with Aldefluor and CD133 Activity have a Cancer Stem Cell Potential. *Clinical sarcoma research* **1**, 8, doi:10.1186/2045-3329-1-8 (2011).
- 97 Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews. Cancer* **5**, 275-284, doi:10.1038/nrc1590 (2005).
- 98 Achuthan, S., Santhoshkumar, T. R., Prabhakar, J., Nair, S. A. & Pillai, M. R. Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* **286**, 37813-37829, doi:10.1074/jbc.M110.200675 (2011).
- 99 Naka, N. *et al.* Synovial sarcoma is a stem cell malignancy. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **28**, 1119-1131, doi:10.1002/stem.452 (2010).
- 100 Martinez, C., Hofmann, T. J., Marino, R., Dominici, M. & Horwitz, E. M. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood* **109**, 4245-4248, doi:10.1182/blood-2006-08-039347 (2007).
- 101 Battula, V. L. *et al.* Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2066-2078, doi:10.1172/jci59735 (2012).
- 102 Liu, T. J. *et al.* CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene* **32**, 544-553, doi:10.1038/onc.2012.85 (2013).
- 103 Sango, K., Johnson, O. N., Kozak, C. A. & Proia, R. L. beta-1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase involved in ganglioside synthesis: cDNA sequence, expression, and chromosome mapping of the mouse gene. *Genomics* **27**, 362-365, doi:10.1006/geno.1995.1058 (1995).
- 104 Rudolph, G., Schilbach-Stuckle, K., Handgretinger, R., Kaiser, P. & Hameister, H. Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS. *Human genetics* **86**, 562-566 (1991).
- 105 Battula, V. P., B.; Nguyen, K., Sun, JC; Jin, F.; Coarfa, C.; Nagireddy, F.; Andreeff, M. *Metabolic stress induces GD2 expression and cancer stem cell phenotype in triple negative breast cancer*, <http://cancerres.aacrjournals.org/content/77/4_Supplement/P6-02-01 Access Date 12.04.2017> (2016).
- 106 Yoshida, S. *et al.* Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer research* **61**, 4244-4252 (2001).
- 107 Finke, J. H. *et al.* Tumor-induced sensitivity to apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma: role of nuclear factor-kappaB suppression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**, 940s-946s (2001).

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AI	Polychemotherapie bestehend aus Doxorubicin und Ifosfamid
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocanin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDR	<i>Complementary Determining Region</i>
CEP	<i>Chromosome Enumeration Probe</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
COG	<i>Children's Oncology Group</i>
CSC	<i>Cancer stem cell</i> ; Krebsstammzelle
CT	Computer Tomographie
DC	<i>Dendritic Cell</i> , Dendritische Zelle
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EIA	Polychemotherapie bestehend aus Etoposid, Ifosfamid und Doxorubicin
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FACS	Fluoreszenz-Aktivierte Zellsortierung
FasL	<i>Fas Ligand</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FNCLCC	<i>Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GM-CSF	<i>Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor</i>

GVHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
GvM	<i>Graft versus Malignancy</i>
Gy	Gray
HAMA	humane Anti-Maus Antikörper
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Hsp 70	Hitzeschockprotein 70
IE	Internationale Einheiten
IL-15	Interleukin 15
IL-2	Interleukin 2
IFN- γ	Interferon γ
K _D	Dissoziationskonstante
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LSI	<i>Locus Specific Identifier</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> ; Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MRT	Magnetresonanz Tomographie
MSC	<i>Mesenchymal stroma cell</i> ; mesenchymale Stammzellen
NCR	<i>Natural cytotoxicity receptor</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> ; Nicht-kleinzelliges Bronchial Karzinom
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> ; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PE	Phycoerythrin
PE/CY5	Phycoerythrin/Cyanin
R0	Tumorresektion im Gesunden
R1	marginale Tumorresektion
R2	intraläsionale Tumorresektion
RHT	regionale Hyperthermie
rpm	Rotationen pro Minute
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i> , kleinzelliges Bronchialkarzinom
SSC	<i>Sidescatter</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>

STS	<i>Soft-tissue sarcoma</i> , Weichteilsarkom
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
U	Units
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
ULBP	<i>UL16 binding protein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Chemische Struktur des GD2-Antigens	11
Abbildung 3-1	Gatingstrategie zur GD2-basierten Sortierung von SW872	27
Abbildung 4-1	Vergleich der Zytotoxizität von Spender- und Patienten-NK-Zellen gegen K562	32
Abbildung 4-2	Titration PE Anti-GD2 Antikörper	33
Abbildung 4-3	GD2-Expression auf Neuroblastom-Zelllinien	33
Abbildung 4-4	GD2-Expression der Liposarkom-Zelllinie SW872	34
Abbildung 4-5	GD2-Expression auf Ewing-Sarkom-Zelllinien	35
Abbildung 4-6	GD2-Expression der Leiomyosarkom-Zelllinie SKUT-1	35
Abbildung 4-7	GD2-Expression auf Rhabdomyosarkom-Zelllinien	36
Abbildung 4-8	GD2 Expression der Synovialsarkom-Zelllinie SW982	36
Abbildung 4-9	Titration des ch14.18 Antikörpers	37
Abbildung 4-10	GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gegen SW872.....	38
Abbildung 4-11	GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gegen TC-71	39
Abbildung 4-12	GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gegen SKUT-1.....	40
Abbildung 4-13	Vergleich der Zytotoxizität von ch14.18 und ME36.1	41
Abbildung 4-14	GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen von STS-Patienten gegen SW872.....	42
Abbildung 4-15	Vergleich der GD2-vermittelten Zytotoxizität von Patienten und gesunden Spendern	43
Abbildung 4-16	Vergleich von NK-Zell Populationen vor und nach Expansion	44
Abbildung 4-17	Oberflächenmarker-Expression von NK-Zellen vor und nach Expansion ..	45
Abbildung 4-18	Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen SW872	46
Abbildung 4-19	Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen TC-71	46
Abbildung 4-20	Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen SKUT-1	47
Abbildung 4-21	GD2-vermittelte Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen SW872	48
Abbildung 4-22	Vergleich frischer und kryokonservierter NK-Zellen	49
Abbildung 4-23	Zytotoxizität expandierter NK-Zellen nach IL-basierter Restimulation	50
Abbildung 4-24	GD2-vermittelte Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen TC-71	50
Abbildung 4-25	GD2-vermittelte Zytotoxizität expandierter NK-Zellen gegen SKUT-1	51
Abbildung 4-26	GD2-Expression vor und nach Sortierung der Zelllinie SW872	52
Abbildung 4-27	Kinetik der GD2-Expression der Subpopulationen von SW872	53
Abbildung 4-28	Fluoreszierende Gensonden auf SW872 Subpopulationen	55
Abbildung 4-29	Zusammenhang zwischen GD2-vermittelter Zytotoxizität und GD2-Expression bei Subpopulationen von SW872	59

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1	Geräte	16
Tabelle 3-2	Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 3-3	Medien, Chemikalien, Reagenzien.....	18
Tabelle 3-4	FACS-Antikörper und Isotypkontrollen	18
Tabelle 3-5	Therapeutische Antikörper	19
Tabelle 3-6	FISH-Sonden.....	19
Tabelle 3-7	Zytokine	19
Tabelle 3-8	Zelllinien	20
Tabelle 3-9	Zusammensetzung FACS-Puffer und FACS-Fix.....	24
Tabelle 4-1	Patientencharakteristika	30
Tabelle 4-2	Spendercharakteristika.....	31
Tabelle 4-3	Übersicht: GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender gegen SW872	39
Tabelle 4-4	Übersicht: GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender gegen TC-71	40
Tabelle 4-5	Übersicht: GD2-vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen gesunder Spender gegen SKUT-1	41
Tabelle 4-6	Übersicht: GD2 vermittelte Zytotoxizität unstimulierter NK-Zellen von Sarkompatienten gegen SW872.....	42
Tabelle 4-7	FISH-Befund SW872 Subpopulationen	54
Tabelle 4-8	STR-Profil der Zelllinie SW872.....	57
Tabelle 4-9	PCR auf animalische Zellen bei der Zelllinie SW872	57

8.4 Patienten- und Probandeninformation



CAMPUS GROSSHADERN
MEDIZINISCHE KLINIK UND
POLIKLINIK III
DIREKTOR: PROF. DR. W. HIDDEMANN



Klinikum der Universität München · Medizinische Klinik und Poliklinik III ·
Marchioninistr. 15, 81377 München

Ansprechpartner:

Prof. Dr. R. Issels
Prof Dr. med. M. Subklewe
Dr. V. Bücklein

Telefon +49 (0)89 7095 – 0

rolf.issels@med.uni-muenchen.de
marion.subklewe@med.uni-muenchen.de
veit.buecklein@med.uni-muenchen.de

München, 01. März 2014

Patienten- und Probandeninformation

In vitro-Studie zur Etablierung neuer Immuntherapien bei Patienten mit Weichteilsarkomen

Bevor Sie Ihre Zustimmung zur Teilnahme an dieser Untersuchung geben, ist es wichtig, dass Sie diese Patienteninformationen aufmerksam lesen und verstehen. Wenn Sie etwas nicht verstehen, fragen Sie bitte Ihren behandelnden Arzt.

Sehr geehrte(r) Patient/in, sehr geehrte(r) Blutspender,

wir laden Sie ein, an der oben genannten Untersuchung teilzunehmen. Bevor Sie sich dafür oder dagegen entscheiden, ist es wichtig für Sie zu verstehen, warum diese Untersuchung durchgeführt wird und was sie beinhaltet. Sie werden über den Nutzen und die möglichen Risiken einer Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung von Ihrem behandelnden Arzt umfassend aufgeklärt. Bitte nehmen Sie sich darüber hinaus die Zeit, die folgenden Informationen sorgfältig durchzulesen, und besprechen Sie sie eventuell mit einer vertrauten Person und Ihrem behandelnden Arzt. Sie können uns jederzeit fragen, wenn Sie etwas nicht verstehen oder gerne weitere Informationen hätten. Entscheiden Sie ganz in Ruhe, ob Sie an der Studie teilnehmen wollen oder nicht.

Die Teilnahme an dieser Untersuchung ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen durch Sie beendet werden, ohne dass Ihnen hierdurch Nachteile entstehen.

Unverzichtbare Voraussetzung für die Durchführung dieser Untersuchung ist, dass Sie Ihr Einverständnis zur Teilnahme schriftlich erklären. Bitte lesen Sie den folgenden Text als Ergänzung zum ärztlichen Informationsgespräch sorgfältig durch und zögern Sie nicht, Fragen zu stellen.

Bitte unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung nur

- wenn Sie Art und Ablauf der Untersuchung vollständig verstanden haben,
- wenn Sie bereit sind, der Teilnahme zuzustimmen und
- wenn Sie sich über Ihre Rechte als Teilnehmer an dieser Untersuchung im Klaren sind.

Diese Untersuchung, die Patienteninformation und Einwilligungserklärung wurden von der zuständigen Ethikkommission geprüft und es bestanden dagegen keine Einwände.

1. Hintergrund zur untersuchten Erkrankung und zur Behandlung

Weichteilsarkome sind seltene bösartige Tumorerkrankungen, die vom Bindegewebe ausgehen und überall im Körper auftreten können. Standardtherapie dieser Tumore ist die vollständige operative Entfernung. Diese ist jedoch nicht bei allen Patienten anwendbar, da der Tumor möglicherweise in lebenswichtige Organe einwächst oder bereits Absiedelungen in anderen Organen (Metastasen) gebildet hat.

Bei diesen Patienten kommt eine Chemotherapie, möglicherweise in Kombination mit regionaler Hyperthermie, also eine Erwärmung des Tumors oder des ehemaligen Tumorgebiets, zum Einsatz. Es gelingt jedoch auch unter Anwendung dieser Therapieverfahren nur in einem Teil der Patienten, eine dauerhafte Heilung der Erkrankung zu erreichen. Das Risiko ist hoch, dass die Erkrankung trotz entsprechender Therapie weiter fortschreitet oder wiederkehrt (rezidiert). Deshalb wird nach Wegen gesucht, die krankheitsfreie Zeit bei diesen Patienten zu verlängern oder die Rate an Rezidiven zu senken. Ein möglicherweise erfolgversprechender Ansatz ist die Unterstützung des patienteneigenen Immunsystems, da die Immunabwehr eine wichtige Rolle in der Verhinderung und Bekämpfung von Tumorerkrankungen spielt.

2. Ziel der Untersuchung

Im Rahmen dieser Untersuchung werden Ihre weißen Blutkörperchen hinsichtlich Zahl und Funktion untersucht und diese Werte mit den Ergebnissen von Untersuchungen an gesunden Spendern verglichen. Hierzu werden weiße Blutkörperchen, die über eine normale Blutentnahme gewonnen werden, bezüglich des Vorhandenseins bestimmter Eiweißen auf ihrer Zelloberfläche untersucht (sog. Durchflusszytometrie). Mit Hilfe dieser Analyse ist es möglich, die Zellen verschiedenen Untergruppen zuzuordnen und Informationen über ihre Funktion zu erhalten. Durch den Vergleich mit gesunden Spendern kann erkannt werden, ob Zellen bestimmter Untergruppen in erhöhter oder verminderter Zahl im Blut vorliegen. Dies lässt Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit Ihres Immunsystems zu. Insgesamt sollen diese Untersuchungen an 30 Patienten und zu Vergleichszwecken auch an 10 gesunden Probanden durchgeführt werden.

In einem zweiten Schritt sollen bei 2 – 6 der untersuchten Patienten Analysen der Funktionsfähigkeit von Zellen einer bestimmten Lymphozyten-Untergruppe, den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), erfolgen sowie eine Vermehrung dieser NK-Zellen im Brutschrank versucht werden. Dabei sollen NK-Zellen aus Ihrem Blut durch Lagerung in einer nährstoffreichen Flüssigkeit und Hinzufügung von Signalstoffen, die eine Teilung der Zellen auslösen, in ihrer Zahl deutlich gesteigert werden. Ziel ist die Erreichung einer Zellzahl, wie sie für die Verwendung für therapeutische Zwecke notwendig ist. Wird diese Zellzahl erreicht, sollen wiederum durchflusszytometrische Analysen erfolgen, um erneut Informationen über ihre Funktion erhalten. Genetische Untersuchungen werden jedoch **nicht** durchgeführt.

3. Möglicher Nutzen der Teilnahme für den Probanden

Die Untersuchung dient vorerst einem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn, der zur Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung von Patienten mit Weichteilsarkomen beitragen soll. Damit hat die vorliegende Untersuchung für Sie keinen möglichen Nutzen, Sie tragen jedoch möglicherweise zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten von zukünftigen Patienten mit Weichteilsarkom.

4. Ablauf der Untersuchung

Im Rahmen einer Routine-Blutentnahme werden Ihnen circa 10 – 20 ml Blut für die oben beschriebenen Forschungszwecke entnommen.

Sollten Sie aufgrund der Ergebnisse der ersten Analyse für die oben erwähnten weiterführenden Untersuchungen zur Funktionsfähigkeit der NK-Zellen und zur

Vermehrung dieser Zellen in Frage kommen, wird, Ihr Einverständnis vorausgesetzt, bei Ihnen einmalig eine Entnahme von 80-100ml Blut durchgeführt.

5. Abbruch der Untersuchung

Wenn Sie sich dazu bereit erklären, an der Untersuchung teilzunehmen, haben Sie das Recht, jederzeit ohne Angabe von Gründen die Zusage zur Teilnahme an der Untersuchung zurückzuziehen und die Untersuchung abubrechen.

Der verantwortliche Leiter der Studie hat das Recht, Ihre Teilnahme an der Untersuchung zu beenden, wenn schwerwiegende Begleiterkrankungen, unannehmbar unerwünschte Ereignisse, Verletzungen des Untersuchungsprotokolls oder andere Gründe vorliegen, denen zufolge der Abbruch im besten medizinischen Interesse liegt.

6. Risiken und Nebenwirkungen der Untersuchung

Zusätzliche Risiken oder Nebenwirkungen sind bei Entnahme von 5 – 10ml Blut im Rahmen einer Routine-Blutentnahme nicht zu erwarten. Bei Entnahme einer größeren Blutmenge (80 – 100 ml) sollten Sie darauf achten, genügend Flüssigkeit zu sich zu nehmen, um möglicherweise auftretenden Schwindel und ein Schwächegefühl im Anschluss an die Blutentnahme zu vermeiden. Außerdem sollten Sie in den ersten Stunden nach Durchführung dieser Blutentnahme vorsichtig bei Lageänderungen, z.B. beim Aufstehen aus liegender Position, sein.

7. Schweigepflicht/Vertraulichkeit der Daten/Datenschutz

Bei dieser Untersuchung werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und weitergegeben werden diese Daten jedoch nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form, d.h. weder Ihr Name noch ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode.

Es kann Einsicht in die Originaldaten durch autorisierte Personen genommen werden, vor allem zur Überwachung der Untersuchungssicherheit. Im Falle eines Widerrufs der Einwilligung werden die gespeicherten Daten irreversibel anonymisiert und weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiter Herr Prof. Dr. R. Issels und Frau PD Dr. M. Subklewe, ihre Stellvertreter Herr Prof. Dr. W. Hiddemann, Frau Dr. D. Sauter und Herr V. Bücklein.

Die Unterlagen werden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III aufbewahrt. Die außerhalb der Krankenakte aufgezeichneten Daten werden 10 Jahre, die in die Krankenakte aufgenommenen Daten 30 Jahre aufbewahrt und danach gelöscht bzw. vernichtet.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit ihrer persönlichen Daten in jedem Fall gewährleistet; wenn überhaupt, werden die Daten in verschlüsselter Form verwendet.

Wenn Sie diese Patienten- und Probandeninformation in Ruhe gelesen und mit der Teilnahme an der Untersuchung einverstanden sind, dann bestätigen Sie dies bitte mit Ihrer Unterschrift auf der Einwilligungserklärung. Dieses Einverständnis kann von Ihnen selbstverständlich jederzeit und ohne Angaben von Gründen widerrufen werden.

Wir danken Ihnen für Ihre Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Untersuchung!

Einwilligungserklärung

In vitro-Studien zur Etablierung neuer Immuntherapien bei Patienten mit Weichteilsarkomen

Name _____

Vorname _____

Geburtsdatum _____

Patienten/Probandennummer _____

Ich habe die von Frau/Herrn Dr. med. _____ unternommene Aufklärung über Art und Durchführung sowie die Risiken der betreffenden wissenschaftlichen Untersuchung verstanden und hatte ausreichend Gelegenheit, meine Fragen hierzu in einem Gespräch mit dem aufklärenden Arzt zu klären. Ferner hatte ich die Gelegenheit, die „Patienten- und Probandeninformation“ durchzulesen und auch dazu Fragen zu stellen. Die von mir gestellten Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet. Ich konnte mir genügend Zeit nehmen, bevor ich meine Entscheidung zur Teilnahme getroffen habe.

Eine Kopie dieser Patienten- und Probandeninformation sowie der vorliegenden Einwilligungserklärung habe ich vom aufklärenden Arzt erhalten.

Ich bin bereit an der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der o.g. Studie teilzunehmen.

Die Teilnahme ist freiwillig. Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten jederzeit widersprechen kann.

Ich bin damit einverstanden, dass der Studienleiter oder -arzt sich mit meinem/r behandelndem/n Arzt/Ärztin im Rahmen dieser Studie in Verbindung setzt.

Ich bin darüber aufgeklärt, dass die vorliegende Untersuchung nach nationalen sowie internationalen Qualitätsstandards durchgeführt wird. Dementsprechend gelten die nachfolgenden

Datenschutzbestimmungen:

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, und gespeichert, aber nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form weitergegeben, d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode.

Es kann Einsicht in die Originaldaten durch autorisierte Personen genommen werden, vor allem zur Überwachung der Studiensicherheit. Im Falle eines Widerrufs der Einwilligung werden die gespeicherten Daten irreversibel anonymisiert und weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiter Herr Prof. Dr. R. Issels und Frau PD Dr. M. Subklewe, ihre Stellvertreter Herr Prof. Dr. W. Hiddemann, Frau Dr. D. Sauter und Herr V. Bücklein.

Die Unterlagen werden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III aufbewahrt. Die außerhalb der Krankenakte aufgezeichneten Daten werden 10 Jahre, die in die Krankenakte aufgenommenen Daten 30 Jahre aufbewahrt und danach gelöscht bzw. vernichtet.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit meiner persönlichen Daten ebenfalls gewährleistet; wenn überhaupt, werden die Daten in verschlüsselter Form verwendet.

Die Beachtung des Bundesdatenschutzgesetzes ist in vollem Umfange sichergestellt.

Den Inhalt der vorliegenden Einwilligungserklärung habe ich verstanden; mit der vorstehend geschilderten Vorgehensweise bin ich einverstanden.

Einwilligungserklärung zur Datenverarbeitung

Ich willige darin ein, dass die wissenschaftliche Einrichtung Klinikum der Universität München, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Campus Großhadern, mich betreffende personenbezogene Daten und Gesundheits- bzw. Krankheitsdaten im Rahmen und zum Zweck des o.g. Forschungsvorhabens verarbeitet.

Ich willige darin ein, dass meine im Rahmen der o.g. Studie erhobenen Krankheitsdaten aufgezeichnet, verschlüsselt (pseudonymisiert), verschlüsselt (pseudonym) gespeichert und die pseudonymisierten Ergebnisse veröffentlicht werden.

Darüber hinaus bin ich mit der Entnahme, Herauslösung, Untersuchung sowie verschlüsselten (pseudonymisierten) Lagerung meines im Rahmen dieser klinischen Studie entnommenen Blutes für den Zweck der Studie durch den/die Studienarzt/-Studienärztin bzw. das Labor für Leukämiediagnostik einverstanden.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die vorgenannte Untersuchung einschließlich der dafür notwendigen ärztlichen Untersuchungen an mir durchgeführt wird, und ich stimme der Aufzeichnung meiner Daten/Krankheitsdaten sowie der Einsichtnahme in meine Akte in der oben beschriebenen Form zu.

München, den _____

Unterschrift Proband / Patient

Hiermit erkläre ich, den/die o.g. Versuchsteilnehmer/in am _____
über Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken dieser klinischen Prüfung mündlich und schriftlich aufgeklärt und ihm/ihr eine Ausfertigung der Information sowie dieser Einwilligungserklärung übergeben zu haben.

München, den _____

Unterschrift Prüfarzt

8.5 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die am Gelingen meiner Dissertation beteiligt waren. Dabei sind als erstes Herr Professor Wolfgang Hiddemann und sein Nachfolger Herr Professor Michael von Bergwelt zu nennen, denen ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der LMU durchführen zu können, danken möchte. Meiner Doktormutter Frau Professorin Marion Subklewe danke ich für die sehr freundliche Aufnahme in ihre außergewöhnliche Arbeitsgruppe, für großes wissenschaftliches Engagement und Hilfsbereitschaft, sowie für die Möglichkeit die Ergebnisse auf einem Kongress zu präsentieren.

Ein großes Dankeschön geht an Veit Bücklein der dieses Projekt hervorragend betreute und maßgeblich vorangetrieben hat. Trotz hoher Arbeitsbelastung zeigte er stets großes Interesse und nahm sich immer Zeit für meine Fragen, Ideen und Anregungen und hatte damit einen entscheidenden Anteil am Abschluss der Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen im Labor. Dabei ist Christina Krupka hervorzuheben, die bei komplexen Fragestellungen inhaltlicher oder methodischer Natur immer mit sehr guten Anregungen und Ideen parat stand. Kerstin Lämmermann, Anna Jansen von Havighorst und Marina Leeping danke ich für die sehr nette Aufnahme und Einarbeitung in den Laboralltag, sowie für ihre stetige Unterstützung.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit möchte ich Professor Hoffmeister sen. und seinen Kollegen von der Zellwerk GmbH danken. Bei Philipp Lang und Patrick Schlegel aus der Kinderonkologie der Eberhard Karls Universität zu Tübingen möchte ich mich für die Bereitstellung des ch14.18 Antikörpers bedanken. Frau Dr. Stephanie Schneider danke ich für die freundliche Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Labor für Leukämiediagnostik.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, denen diese Dissertation gewidmet ist, für ihre großartige Unterstützung und dauerhaften Rückhalt während meiner Ausbildung sowie der Ermöglichung dieser.

8.6 Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht.

8.6.1 Poster

T. Jorg, V. Bücklein, C. Krupka, F. Schnorfeil, T. Knösel, P. Schlegel, P. Lang, L. Lindner, W. Hiddemann, M. Subklewe. Targeting GD2 on soft-tissue sarcoma to enhance Natural Killer cell activity. 16. Wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III - Klinikum der Universität München, Freising, 2014

T. Jorg, V. Bücklein, D. Pass, C. Krupka, P. Schlegel, P. Lang, H. Hoffmeister sen., L. Lindner, W. Hiddemann, M. Subklewe. Immunotherapeutic strategies for soft-tissue sarcoma: preclinical results of Natural Killer cell augmentation by ex vivo expansion and use of an Anti-GD2 antibody. DGHO Jahrestagung, Basel, 2015

8.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias Justus Jorg
geboren: 23.08.1989 in Wiesbaden

Beruf

Seit 12/2017 wissenschaftlicher Mitarbeiter
Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle
Radiologie, Universitätsmedizin Mainz

Studium

2010 - 2017 Studium der Humanmedizin an der LMU, München

09/2012 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2014 - 2015 Experimentelle Forschung KKG Immuntherapie, Medizinische
Klinik III, LMU München

4/2016 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2016 - 2017 Praktisches Jahr
4 Monate Innere Medizin, University of Hong Kong und Queen
Mary University of London
4 Monate Chirurgie, Stellenbosch University, Südafrika
4 Monate Urologie, Urologische Klinik der LMU Großhadern

06/2017 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Schulbildung und Dienst

06/2009 Allgemeine Hochschulreife
Main-Taunus-Schule, Hofheim am Taunus

2009 – 2010 Zivildienst als Pflegehilfskraft in der plastischen Chirurgie,
Kliniken des Main Taunus Kreises, Bad Soden